

Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung
in *Arabidopsis thaliana*:
Vergleichende Promotoranalyse
der Aktivatoren *GLABRA1* und *WEREWOLF* sowie
der Inhibitoren *TRIPTYCHON* und *CAPRICE*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Martina Pesch

aus Udenbreth

2005

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Hülskamp
Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2005

INHALTSVERZEICHNIS

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung	2
1.1.1 Das epidermale Muster der Trichome und der Wurzelhaare	2
1.1.2 Faktoren des Musterbildung: Aktivatoren und Inhibitoren	4
1.1.3 Phänotyp der Mutanten der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildungsfaktoren	7
1.1.4 Ein gemeinsames Modell für die Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung	7
1.1.5 Expression der Gene, die an der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung beteiligt sind	9
1.2 Regulation der Transkription	9
1.2.1 Generelle Prinzipien der transkriptionellen Regulation	9
1.2.2 Modulärer Aufbau von regulatorischen Sequenzen	11
1.3 Koexprimierte Gene und das Schicksal von duplizierten Genen	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Ergebnisse	17
2.1 Herstellung eines neuen Expressionsvektors	17
2.1.1 PARB als Grundlage für die Fragmentanalyse von Promotoren	17
2.1.2 Funktionale Überprüfung des Expressionsvektors PARB	18
2.1.3 Die Expressionstärke von PARB	19
2.2 Untersuchungen zur Variabilität transformierter Pflanzen	20
2.3 Charakterisierung der regulatorischen Sequenzen des <i>GLABRA1</i> Gens	23
2.3.1 Untersuchung zur Expression des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers von GL1	23
2.3.2 Transkriptionsmuster und Rettungseffizienz des 3'-GL1-Enhancers in 3'-Position zum kodierenden Bereich des GL1-Gens	28
2.3.3 Kombination des 3'-Enhancers von GL1 mit dem 35S-Promotor	31
2.3.4 Vergleichende Untersuchung des 5'-Promotors von GL1 in Ler und Col Hintergrund	34
2.3.5 Identifikation des Transkriptionsstartes von GL1	37
2.3.6 Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche des 5'-Promotors von GL1	38
2.3.7 Kombinatorik der unterschiedlichen 5'-Subfragmente des GL1-Gens	43
2.3.8 Weitere Untersuchung des 5'-Subfragments Pr1 des GL1 Gens	46
2.3.9 In Silico Untersuchung des 5'-Promotors von GL1	47
2.3.10 Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche des 3'-Enhancers von GL1	53
2.3.11 Weitere Untersuchung der 3'-Enhancer-Subfragmente des GL1 Gens	61
2.3.12 In Silico Untersuchung des 3'-GL1-Enhancerbereiches	64
2.3.13 Vergleich der unterschiedlichen Module der regulatorischen Regionen von GL1	67
2.3.14 Einfluss von GL1 auf die Transkription der regulatorischen Bereiche von GL1	69
2.3.15 GA-abhängiges Transkriptionsmuster der regulatorischen Bereiche von GL1	70
2.3.16 Einfluss von GeBP auf die Regulation von GL1	73
2.3.17 Rettung des gl1 Hintergrundes mit der GL1-cDNA unter der Regulation unterschiedlicher Promotoren	

2.4	Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des <i>WEREWOLF</i>-Gens	79
2.4.1	Eingrenzung des WER-Promotors	79
2.4.2	Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche der 5'- Promotors von WER	81
2.4.3	Deletionen der WER-Promotorfragments Pr19 und Pr20	84
2.4.4	In Silico Untersuchung der 5'-Promotors von WER	87
2.5	Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des <i>TRIPTYCHON</i>-Gens	92
2.5.1	GUS-Expression unter dem TRY-Promotor mit dem Vektorsystem PARB	92
2.5.2	Eingrenzung des TRY-Promotors	93
2.5.3	Expression von TRY in cpc try Hintergrund	95
2.5.4	Untersuchung der Rettungseffizienz des TRY-Promotors in try und cpc try Hintergrund	99
2.5.5	GUS-Expression der Deletionsfragmente des TRY-Promotorfragments Pr23	105
2.5.6	Untersuchung der Rettungseffizienz der deletierten Fragmente des TRY-Promotorfragments Pr23 in try und cpc try Hintergrund	106
2.5.1	In Silico Untersuchung des eingegrenzten TRY-Promotors Pr15 und Fragment-33	108
2.5.8	TTG2- und GL2-abhängiges Transkriptionsmuster des TRY-Promotors	111
2.5.9	GA-abhängiges Transkriptionsmuster des TRY-Promotors	112
2.5.10	Regulation der TRY-Expression durch Faktoren der Trichom-Musterbildung	113
2.5.11	Rettung des try-Hintergrunds mit der TRY-cDNA unter der Regulation unterschiedlicher Promotoren	116
2.6	Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des <i>CAPRICE</i>-Gens	121
2.6.1	Eingrenzung des CPC Promotors	121
2.6.2	GUS-Expression der Deletionsfragment des CPC-Promotors Pr17	122
2.6.3	In Silico Untersuchung des eingegrenzten CPC-Promotors	126
2.6.4	Mutagenese verschiedener, cis-regulatorischen Elemente des CPC-Promotors Pr17	128
2.6.5	Regulation der CPC-Expression durch Faktoren der Trichom-Musterbildung	130
2.7	Vergleich der regulatorischen Bereiche der analysierten Promotoren	131
2.7.1	Vergleich der regulatorischen Region von TRY und CPC	131
2.7.2	Vergleich der regulatorischen Bereiche von GL1 und WER	135
2.8	Versuche zur Isolation der Proteine der Musterbildungsgene	138
2.8.1	HIS-markierte Proteine in E. coli	138
2.8.2	Versuche zur Detektion HA-fusionierter Proteine der Musterbildungsgene in Arabidopsis thaliana	140
3.	Diskussion	143
3.1	Kritische Betrachtung der experimentellen Untersuchungen	143
3.1.1	Der Expressionsvektor PARB	143
3.1.2	Variationsbreite der transgenen Linien eines Konstruktes	145
3.1.3	Versuche zur Proteinüberexpression der Musterbildungsfaktoren	146
3.2	Das regulatorische System von <i>GLABRA1</i> und <i>WEREWOLF</i> im Vergleich	147
3.2.1	Der 5'-Promotor von GL1 besitzt gewebespezifische, regulatorische Information	147
3.2.2	Klassifizierung des historischen „3'-Enhancers“ als Enhancer mit gewebespezifischer Information	148
3.2.3	Synergistische Interaktion des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers von GL1	149
3.2.4	Andere regulatorische Bereiche des GL1-Gens	152
3.2.5	Kombinatorische Eigenschaften der regulatorischen Module von GL1	153
3.2.6	Regulatorische Bereiche und Kombinatorik des WER-Gens	155
3.2.7	Mutmaßliche, transagierende Faktoren der regulatorischen Sequenzen von GL1	156
3.2.8	Mutmaßliche, transagierende Faktoren der regulatorischen Sequenzen von WER	171
3.2.9	Gemeinsamkeiten der regulatorischen Regionen von GL1, WER, GL2, AtML1 und AtMYB23	173
3.3	Die Regulation von <i>TRIPTYCHON</i> und <i>CAPRICE</i>	175
3.3.1	Eine Minimalregion und ein Enhancer für die Regulation der TRY-Expression	175
3.3.2	Erklärungen für die verstärkende Funktion des proximalen Enhancers von TRY	179
3.3.3	Regulation des distalen Fragments von Pr15 von TRY	180
3.3.4	MYB-, bHLH- und HD-ZIP-Faktoren als Regulatoren des TRY-Gens	181
3.3.5	TTG2 als transkriptioneller Regulator des TRY-Gens	184
3.3.6	TRY inhibiert seine eigene Expression	186
3.3.7	Zusammenfassung der transkriptionellen Regulation von TRY	187
3.3.8	Transkriptionelle Regulation von CPC im Rosettenblatt	190
3.3.9	Transkriptionelle Regulation von CPC in der Wurzelepidermis	193

3.4	Aktivatoren und Inhibitoren unterliegen transkriptioneller Regulation von sehr unterschiedlicher Komplexität	197
4.	MATERIAL UND METHODEN	200
4.1	Materialien	200
4.1.1	Chemikalien und Antibiotika	200
4.1.2	Enzyme	200
4.1.3	Molekularbiologische Kits	200
4.1.4	Verwendete Oligonukleotide	200
4.1.5	Verwendete Vektoren	206
4.1.6	Bakterienstämme	207
4.1.7	Pflanzenlinien	208
4.2	Allgemeine molekulare Methoden	208
4.2.1	RNA-Isolation	208
4.2.2	Isolation pflanzlicher genomischer DNA	209
4.2.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	209
4.2.4	DNA-Manipulation	209
4.2.5	PCR-Bedingungen	210
4.2.6	Mutagenese und Fusion von PCR-Fragmenten	210
4.2.7	Reverse Transkription und Amplifikation von cDNA-Enden	211
4.2.8	Southern Blotting	211
4.3	Konstrukte	212
4.3.1	Herstellung der Destinationsvektoren für die Gateway-LR-Reaktionen	212
4.3.2	Herstellung der Entry-Klone für die Gateway-LR-Reaktionen	215
4.3.3	Herstellung der finalen GUS-Reporter-, Rettungs- und Expressionskonstrukte	219
4.4	Proteinexpression in Bakterien	223
4.4.1	Bestimmung der optimalen IPTG-Konzentration	223
4.4.2	Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Agarose	224
4.5	Biochemische Analyse von pflanzlichen Proteinen	225
4.5.1	Denaturierender Proteinextrakt und gelelektrophoretische Auftrennung	225
4.5.2	Proteinbestimmung mit Amidoschwarz	225
4.5.3	TCA-Fällung	226
4.5.4	SDS-PAGE	226
4.5.5	Western-Blotting	226
4.5.6	Antikörperdetektion und Visualisierung	226
4.6	Pflanzentransformation	227
4.6.1	Stabile Transformation	227
4.6.2	Transiente Transformation	228
4.7	Methoden zur Pflanzenarbeit	229
4.7.1	Pflanzenanzucht auf Erde	229
4.7.2	Selektion von Pflanzen auf Erde	229
4.7.3	Herstellung von MS-Platten und Additive	229
4.7.4	Sterilisation von Samen	229
4.7.5	Kreuzungen	230
4.8	Mikroskopie und Zytologische Methoden	230
4.8.1	Analyse der GUS-Reporter-Linien	230
4.8.2	Histochemie	230
4.8.3	Mikroskopie	230
4.8.4	Analyse der GUS gefärbten Pflanzen	230
4.8.5	Dokumentation morphologischer Phänotypen	231
4.8.6	Auswertung der Rettung der Hintergründe gl1, try und cpc try	231
	Literaturverzeichnis	233
	DANKE	248
	Erklärung	249
	Lebenslauf	250

ABSTRACT

Epidermal patterning of trichomes and root hairs is a complex process, which is largely determined by interactions of transcriptional activators and inhibitors. The spatiotemporal expression and concentration of these factors are tightly regulated. In this thesis, the transcriptional regulation of *GL1* and *WER*, the main activators during trichome and root hair patterning respectively, and *TRY* and *CPC*, the respective inhibitors, was investigated by comparing their promoter and enhancer regions.

Regulatory regions of these genes were subdivided into overlapping fragments. These were combined with the CaMV-35S minimal promoter and the GUS-gene to investigate the spatiotemporal expression pattern. The combination of the fragments with the CaMV-35S minimal promoter and the cDNA was introduced into the corresponding mutants to study their rescue ability. These two approaches revealed essential promoter regions, which are sufficient to drive the correct expression as well as enhancing and inhibiting regulatory domains. The determination and theoretical analysis of known cis-regulatory elements, i.e. short target sequences of transcription factors, through the PLACE database revealed several putative upstream regulatory signals involved in developmental or environmental pathways. Further deletion studies of the minimal regions lead to the identification of essential sequences to which important regulatory elements could be attributed. The importance of some of these elements was tested through PCR-based mutagenesis. Further results were obtained by GUS expression patterns in various mutant backgrounds, in plants that over expressed putative upstream regulators, and in cotyledons of GUS expressing lines, which were transiently transformed with combinations of overexpressed activators and inhibitors. In addition, promoter and promoter fragment exchange experiments were performed.

For the *GL1* gene it was shown that a short region of the 3'-enhancer contains the most important regulatory information for trichome patterning. This region could be modulated synergistically through several regulatory regions of the *GL1* gene, e.g. the 5'-promoter, which contain specific, enhancing or inhibiting activity. It was demonstrated that the *GL1* expression could be modulated through GL1 itself, GeBP and gibberellins. First analyses of the *WER* gene showed that a proximal 5'-untranscribed fragment contained the main information for the GUS expression. Upstream and downstream regions contained additional regulatory information, and could be synergistically combined. For the *TRY* gene, the essential regulatory region was confined to a 5'-upstream sequence of only 600 nucleotides with a proximal enhancing region. The distal region contained putative bindings sites for the transcription factors of the activator complex (GL1/ *WER*, GL3,

EGL3). Surprisingly also binding sites for GL2 and TTG2 were found, both of which are not considered to participate in early patterning. Furthermore, it was demonstrated that TRY inhibits its own expression, and that gibberellins played a role in up-regulating the leaf-epidermal *TRY* expression. The transcriptional regulation of *CPC* in the leaf differed from that of *TRY*. The essential 5'-upstream region (only 200 nucleotides) contained binding sites of two classes of transcription factors: MYB and WRKY. The promoter regions required for root hair patterning were more complicated in that more cis-elements were necessary for the correct GUS pattern.

These investigations lead to general insights into the regulation of trichome and root hair patterning:

- 1) The activators represent the highest level of the regulatory hierarchy of patterning, and were able to integrate a complex system of upstream signals (cell-, tissue-, organ specific cues, developmental and environmental signals) by transcriptional regulation in a flexible manner. The inhibitors, which were merely targets of the activators, showed a rather simple transcriptional regulation.
- 2) The specificity of the expression was exclusively determined by the combination of binding transcription factors, and not by the linear arrangement of cis-regulatory elements. Therefore, identical transcriptional regulation can be achieved by different factors and cis-elements.
- 3) Despite of similar expression patterns of the genes *GLI*, *TRY*, *CPC* and *WER*, *CPC*, promoter analyses did not reveal any 'trichome or non-root hair specific regulatory box'.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung ist ein komplexer Prozess, der maßgeblich von dem Zusammenspiel der Aktivatoren und Inhibitoren des jeweiligen Zellschicksals abhängt. Die räumlich-zeitliche Expression und Konzentration dieser Faktoren muss fein reguliert werden. In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation von *GLI* und *WER*, den Aktivatoren der Trichom- bzw. Wurzelhaar-Musterbildung, und von *TRY* und *CPC*, den beiden Inhibitoren der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung, durch eine vergleichende Promotoranalyse untersucht.

Dazu wurden die regulatorischen Bereiche in überlappende Fragmente unterteilt und einer zweiteiligen Analyse unterzogen: 1) wurden sie mit dem 35S-Minimalpromotor und dem GUS-Gen kombiniert, um ihr räumlich-zeitliches Expressionsmuster zu untersuchen. 2) wurden sie mit dem 35S-Minimalpromotor und der entsprechenden cDNA kombiniert, um die jeweilig Funktionsverlust-Mutanten auf den wildtypischen Phänotyp zu retten. Auf diese Weise konnten die essentiellen, regulatorische Regionen bestimmt werden, die für die korrekte Expression des jeweiligen Gens verantwortlich sind. Zusätzlich wurden auch Regionen identifiziert, die verstärkenden oder inhibierenden Charakter besitzen. Die Identifikation und theoretische Analyse von bekannten, cis-regulatorischen Elementen, d.h. kurzen DNA-Sequenzen zur Bindung von Transkriptionsfaktoren, wurde mit Hilfe der Datenbank PLACE durchgeführt. Durch weitere Deletionen dieser „Minimalregionen“ konnten essentielle Sequenzen identifiziert werden, denen cis-regulatorische Elemente zugeordnet werden konnten. Die Wichtigkeit dieser Elemente wurde teilweise durch PCR-basierte Mutagenese überprüft. Die Untersuchung der GUS-Expression in Funktionsverlust-Mutanten bzw. in Pflanzen, die mögliche übergeordnete Regulatoren überexprimieren, sowie die transiente Transformation von Kotyledonen der entsprechenden Promotor-GUS Pflanzen mit den überexprimierten, mutmaßlichen Aktivatoren und Inhibitoren eines Promotors lieferte weitere Einblicke. Außerdem wurden Promotoraustausch-Experimente durchgeführt.

Für die *GLI*-Expression konnte zum einen gezeigt werden, dass eine kurze Region des 3'-Enhancers die wichtigste Information für die Trichom-Musterbildung trägt, die durch andere untranslatierte 5'- und 3'-Regionen des *GLI* Gens synergistisch moduliert werden konnte. Die Modulationsfähigkeit durch das eigene Protein, GeBP und Gibberelline konnte nachgewiesen werden. Für das *WER*-Gen zeigten erste Untersuchungen, dass ein proximales 5'-Fragment die Hauptinformation für die korrekte räumlich-zeitliche GUS-Expression trägt, aber auch weitere untranslatierte 5'- und 3'-Bereiche informativen Charakter besaßen und synergistisch kombiniert werden konnten. Die Regulation der *TRY*-Expression konnte auf eine Region von ca. 600 Nukleotiden eingegrenzt werden, wovon der proximale Teil verstärkenden Charakter besitzt. In der

distalen Region konnten die mutmaßlichen Bindungsstellen für die bereits postulierten Komponenten des Aktivorkomplexes (*GL1/ WER*, *GL3*, *EGL3*), sowie für *GL2* und *TTG2*, zwei Transkriptionsfaktoren, denen in dem Musterbildungsmodell bisher keine Rolle für die transkriptionelle Regulation von *TRY* zukommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *TRY* seine eigene Expression inhibieren kann und dass *GA* die *TRY*-Expression im Blatt hochreguliert. Die *CPC*-Expression unterschied sich von der *TRY*-Expression maßgeblich. Hier konnten in der essentiellen, untranslatierten 5'-Region (ca. 200 Nukleotide) bisher nur Bindungsstellen für *MYB*- und *WRKY*-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Die Regulation der *CPC*-Expression in der Wurzel war komplexer als im Rosettenblatt, da hier mehr cis-Elemente für die korrekte *GUS*-Färbung notwendig waren.

Auf diese Weise wurden grundlegende Zusammenhänge der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung erkannt:

- 1) Die Aktivatoren befinden sich auf der höchsten Ebene in der regulatorischen Hierarchie der Musterbildung und können ein komplexes System von übergeordneten Signalen (Zell-, Gewebe-, Organspezifität, sowie entwicklungsbiologische und umweltabhängige Aspekte) durch transkriptionelle Regulation verarbeiten und somit Flexibilität auf diese Reize vermitteln. Die Inhibitoren die zunächst nur Zielgene der Aktivatoren sind, weisen eine eher einfache transkriptionelle Regulation auf.
- 2) Die Spezifität der Expression beruht auf der Kombination der bindenden Transkriptionsfaktoren und nicht auf der linearen Anordnung cis-regulatorischer Elemente. Deshalb können gleiche Expressionsmuster durch verschiedene, bindende Faktoren und cis-Elemente erreicht werden.
- 3) Trotz ähnlicher Expressionsmuster von *GL1*, *TRY*, *CPC* und *WER*, *CPC* konnten die Promotoranalysen keine „Trichom- oder Nicht-Wurzelhaar-spezifische Box“ ermitteln.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Phasen der Trichomentwicklung	3
Abbildung 2:	Postulierte Regulation durch die Transkriptionsfaktoren der Musterbildung.	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den Musterbildungsfaktoren in relativ spätem Stadium.....	8
Abbildung 4:	Moduläre, cis-regulatorische Informationsverarbeitung	12
Abbildung 5:	Vergleich des klassischen Ohno-Modells und des neuen DDC-Modells	14
Abbildung 6:	Graphische Darstellung des hergestellten Basis-Vektors PARB	17
Abbildung 7:	Expression des Konstrukts pGL2-PARB im Rosettenblatt und in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen	18
Abbildung 8:	Vergleich der Expression der Konstrukte mit und ohne Gateway-Rekombinations-stellen und Puffersequenz in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	20
Abbildung 9:	Darstellung eines Southern-Blots verschiedener Linien der Pflanzen R16.....	20
Abbildung 10:	Expression des neu transformierten Konstruktes pGGE4 in Rosettenblättern von Col-Pflanzen	21
Abbildung 11:	Expression verschieden starker Linien des Konstruktes R5 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	22
Abbildung 12:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R5, R6, R37, R38, R11 und R16	23
Abbildung 13:	Expression des Konstruktes R5 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen.....	25
Abbildung 14:	Expression der Konstrukte R37, R38 und R6 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen.....	25
Abbildung 15:	Expression der Konstrukte R11 und R16 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	26
Abbildung 16:	Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R64, R65 und R66.....	26
Abbildung 17:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R64, R65, R66 und der Kontrolle <i>Ler</i>	27
Abbildung 18:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R36-3'-GL1-for, R36-3'-GL1-rev, R5-3'-GL1-for und R5-3'-GL1-rev	28
Abbildung 19:	Expression der Konstrukte R36-3'-GL1-rev und R5-3'-GL1-rev in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	29
Abbildung 20:	Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev	29
Abbildung 21:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev und der Kontrolle <i>Ler</i>	30
Abbildung 22:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte 35S::GUS, 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev	31
Abbildung 23:	Expression der Konstrukte 35S::GUS, 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	32
Abbildung 24:	Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev	33
Abbildung 25:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev und der Kontrolle <i>Ler</i>	34
Abbildung 26:	Unterschiedliche 5'-Promotor-Gesamtfragmente des <i>GLI</i> -Gens	35
Abbildung 27:	Expression der Konstrukte R162 und R222 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> - und Col Pflanzen.....	35
Abbildung 28:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R172, R173, R174 und R222	36

Abbildung 29	Überblick der Ergebnisse der GUS- und Rettungsanalyse des 5'-Promotors von <i>GLI</i> und der zusätzlichen proximalen bzw. distalen Sequenzverlängerungen	37
Abbildung 30:	überlappende Fragmente des 5'-Promotors von <i>GLI</i>	38
Abbildung 31:	Expression der Konstrukte R1, R3 und R4 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	39
Abbildung 32:	Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R160 und R60 bis R63	40
Abbildung 33:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R60, R61, R62 und R63	41
Abbildung 34:	Zusammenfassung der Ergebnisse für die 5'-Promotorfragmente von <i>GLI</i>	42
Abbildung 35:	Fusionen der Fragmente des 5'-Promotors von <i>GLI</i>	43
Abbildung 36:	Expression der Konstrukte R91, R106 und R107 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	44
Abbildung 37:	Expression der Konstrukte R93, R94 und R95 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	45
Abbildung 38:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionen der 5'-Fragmente von <i>GLI</i>	45
Abbildung 39:	Überlappende Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr1 von <i>GLI</i>	46
Abbildung 40:	Expression des Konstruktes R176 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen.....	47
Abbildung 41:	Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotors von <i>GLI</i>	48
Abbildung 42:	Überlappende Fragmente des 3'-Enhancers von <i>GLI</i>	53
Abbildung 43:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R68 bis R77	53
Abbildung 44:	Expression der Konstrukte R68 bis R77 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen.....	55
Abbildung 45:	Zusammenfassung der Ergebnisse der 3'-Enhancersubfragmente ohne und mit 5'-Promotor von <i>GLI</i> der GUS-Analyse	56
Abbildung 46:	Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R121 bis R130	57
Abbildung 47:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R121 bis R130 und R205	59
Abbildung 48:	Zusammenfassung der Ergebnisse der 3'-Enhancersubfragmente ohne und mit 5'-Promotor von <i>GLI</i> der Rettungsanalyse	60
Abbildung 49:	Deletionen der 3'-Enhancersubfragmente-28, -30 und -32 des <i>GLI</i> -Gens	62
Abbildung 50:	Expression der Konstrukte R151 und R188 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	63
Abbildung 51:	Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse der Deletionen des 3'-Enhancersubfragments-30 von <i>GLI</i>	63
Abbildung 52:	Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 3'-Enhancers von <i>GLI</i>	64
Abbildung 53:	Expression der Konstrukte R37, R73, R69 und R5 in Rosettenblättern von <i>gll</i> Pflanzen	69
Abbildung 54:	Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analysen von <i>GLI</i> in der <i>gll</i> Mutante	70
Abbildung 55:	Expression der Konstrukte pGGE4, R5, R1, R38, R11 und R16 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen nach Wachstum auf Paclobutrazol	72
Abbildung 56:	Ergebnisse der GUS-Analysen der GA-Abhängigkeit von <i>GLI</i>	73
Abbildung 57:	Blattrosette und einzelne Rosettenblätter der Pflanzen 35S::GL1, 35S::GeBP und ihrer Kreuzungen....	74
Abbildung 58:	Expression des Konstruktes pGGE4 in Rosetten-blättern von <i>Ler</i> und 35S::GeBP Pflanzen.....	76
Abbildung 59:	Rettungseffizienz der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R163 bis R165, R169 bis R171, pGL2::GL1, pATML1::GFP::GL1, und der Kontrolle <i>Ler</i>	78
Abbildung 60:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R20, R39, R40, R24 und R28	79
Abbildung 61:	Expression der Konstrukte R20 und WER::GUS in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen.....	80
Abbildung 62:	Expression der Konstrukte R39, R40, R24 und R28 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen.....	81

Abbildung 63:	Überlappende Fragmente des 5'-Promotors von <i>WER</i>	81
Abbildung 64:	Expression der Konstrukte R17, R18 und R19 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen.....	82
Abbildung 65:	Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R21 bis R23 und R25 bis R27	82
Abbildung 66:	Expression der Konstrukte R21, R22 und R23 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen.....	83
Abbildung 67:	Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse des 5'-Promotors, der 5'-Promotorfragmente, der 3'-Region und ihrer Kombinationen von <i>WER</i>	84
Abbildung 68:	Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr19 und Pr20 des <i>WER</i> -Gens.....	85
Abbildung 69:	Expression der Konstrukte R96 bis R100 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen.....	86
Abbildung 70:	Expression der Konstrukte R103, R104 und R105 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen	86
Abbildung 71:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen der 5'- <i>WER</i> -Fragmente Pr19 und Pr20	87
Abbildung 72:	Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr20 von <i>WER</i>	88
Abbildung 73:	Expression der Konstrukte R81, R32 und TRY::GUS in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	92
Abbildung 74:	Fragmente des 5'-Promotors von <i>TRY</i>	93
Abbildung 75:	Expression der Konstrukte R80 und R82 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	94
Abbildung 76:	Expression der Konstrukte R81, R80, R32 und R82 in Rosettenblättern von <i>cpc try</i> Pflanzen.....	96
Abbildung 77:	Expression der Konstrukte R81, R80, R32 und R82 in Primärwurzeln und Seitenwurzeln von <i>cpc try</i> Pflanzen	97
Abbildung 78:	Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse der <i>TRY</i> -Promotorfragmente in <i>Ler</i> und <i>cpc try</i> Hintergrund	98
Abbildung 79:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R133, R135, R136 und <i>try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	100
Abbildung 80:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen <i>cpc try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R133, R134, R135 und <i>cpc try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle.....	101
Abbildung 81:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Clusterkategorien (2 Trichome pro Cluster, 3 Trichome pro Cluster, mehr als 3 Trichome pro Cluster) der transgenen <i>cpc try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R133, R134, R135 und <i>cpc try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	102
Abbildung 82:	Phänotyp der Rettung der <i>cpc try</i> Doppelmutante durch die Konstrukte R133, R134 und R135, sowie von <i>cpc try</i>	103
Abbildung 83:	Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der trans-genen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R133, R135, R136 und <i>try</i> sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	104
Abbildung 84:	Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr15 und Pr23 von <i>TRY</i>	105
Abbildung 85:	Expression der Konstrukte R142 und R143 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	106
Abbildung 86:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen <i>cpc try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R202, R203, R204 und <i>cpc try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle.....	107
Abbildung 87:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen des 5'- <i>TRY</i> -Fragments Pr23	107
Abbildung 88:	Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente der 5'-Promotorfragmente Pr15 und Fragment-33 von <i>TRY</i>	108
Abbildung 89:	Expression der Konstrukte R82 bzw. TRY::GUS in Rosettenblättern von <i>tig2</i> - und <i>gl2</i> -Pflanzen.....	111
Abbildung 90:	<i>TRY</i> -Expression in Rosettenblättern nach Wachstum auf Paclobutrazol.....	112
Abbildung 91:	Expression in einzelnen Epidermiszellen nach Partikelbeschuss von TRY::GUS Pflanzen	115

Abbildung 92:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R137, R138, die den 3'-Enhancer von <i>GLI</i> tragen, und <i>try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	117
Abbildung 93:	Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R156, R157, R158, R159, die die regulatorische Information von <i>CPC</i> tragen, und <i>try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	117
Abbildung 94:	Darstellung der Trichomzahlen der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R158, R159 und <i>try</i> sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	118
Abbildung 95:	Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R137, R138, die den 3'-Enhancer von <i>GLI</i> tragen, und <i>try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	119
Abbildung 96:	Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der transgenen <i>try</i> Pflanzen mit den Konstrukten R156, R157, R158, R159, die die regulatorische Information von <i>CPC</i> tragen, und <i>try</i> , sowie <i>Ler</i> zur Kontrolle	121
Abbildung 97:	5'-Promotor-Gesamtfragment und das kleinere Fragment von <i>CPC</i>	121
Abbildung 98:	Expression der Konstrukte R35 und R34 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	122
Abbildung 99:	Expression der Konstrukte R35 und R34 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen	122
Abbildung 100:	Deletionen des 5'-Promotorfragments Pr17 von <i>CPC</i>	123
Abbildung 101:	Expression der Konstrukte R196 bis R198 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	124
Abbildung 102:	Expression der Konstrukte R196 bis R198 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen	125
Abbildung 103:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen des 5'- <i>CPC</i> -Fragments Pr17	125
Abbildung 104:	Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr17 von <i>CPC</i>	126
Abbildung 105:	Schematische Darstellung der Mutagenese der MYB-Elemente und W-Boxen von Pr17	128
Abbildung 106:	Expression der Konstrukte R225 bis R228 in Rosettenblättern von <i>Ler</i> Pflanzen	129
Abbildung 107:	Expression der Konstrukte R226 und R228 in der Primärwurzel von <i>Ler</i> Pflanzen	130
Abbildung 108:	Expression in einzelnen Epidermiszellen nach Partikelbeschuss von pCPC::GUS Pflanzen	130
Abbildung 109:	Alignment der Promotoren der homologen Gene <i>TRY</i> , <i>CPC</i> , <i>ETC1</i> , <i>ETC2</i> und <i>ETC3</i>	131
Abbildung 110:	Gemeinsame Motive der Fragmente Pr15, Pr24, Pr1, 3'-Enhancer und 1. Intron von <i>GLI</i>	133
Abbildung 111:	Schematische Darstellung der Deletionsfragmente zur Überprüfung der Regulation durch Box1 von Fragment-28, -30, -32, Pr23 und Pr17	134
Abbildung 112:	Homologer Bereich zwischen Pr23 und Pr17	135
Abbildung 113:	SDS-PAGE und Western-Blot der in <i>E. coli</i> exprimierten Proteine AtMYB23, WER, CPC, TRY und TTG1	139
Abbildung 114:	SDS-PAGE in <i>E. coli</i> exprimierten Proteine CPC und TRY nach Reinigung über Ni-NTA-Agarose	139
Abbildung 115:	Phänotyp der 35S::TTG2 <i>ttg2-1</i> im Vergleich zu <i>ttg2-1</i> Pflanzen	140
Abbildung 116:	Western-Blot der HA-markierte Proteine der Musterbildungsgene <i>AtMYB23</i> , <i>TRY</i> , <i>CPC</i> , <i>TTG1</i> und <i>GLI</i> aus <i>Arabidopsis</i>	142
Abbildung 117:	Übersicht über die Interaktoriik der cis-regulatorischen Bereiche von <i>GLI</i>	155
Abbildung 118:	Anordnung der cis-regulatorischen Elemente des wichtigen, mittleren 3'-Enhancer-Fragments-30 des <i>GLI</i> -Gens	165

Abbildung 119: Modell zur transkriptionellen Regulation des <i>GLI</i> -Gens.....	170
Abbildung 120: Zusammenfassung der Ergebnisse und Interpretation der <i>TRY</i> -Regulation	190
Abbildung 121: Vergleich der hypothetischen Regulation von <i>CPC</i> und <i>TRY</i> im Rosettenblatt.....	192
Abbildung 122: Zusammenfassung der Ergebnisse und Interpretation der <i>CPC</i> -Regulation	197
Abbildung 123: Prinzip der Einführung von Punktmutationen in DNA durch sequentielle PCRs	211

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R64, R65, R66 und der Kontrolle <i>Ler</i> auf den ersten vier Rosettenblättern	27
Tabelle 2:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev und der Kontrolle <i>Ler</i> auf den ersten vier Rosettenblättern	30
Tabelle 3:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev und der Kontrolle <i>Ler</i> auf den ersten vier Rosettenblättern.....	34
Tabelle 4:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R172, R173, R174 und R222 auf den ersten vier Rosettenblättern.....	37
Tabelle 5:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R60 bis R63 und R160 auf den ersten vier Rosettenblättern	41
Tabelle 6:	Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen 5'-Promotorfragmenten von <i>GL1</i>	49
Tabelle 7:	Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den 5'-Promotor-fragmenten Pr83 zu Pr1 und Pr7 zu Pr5	52
Tabelle 8:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten R121 bis R130 und R205 auf den ersten, vier Rosettenblättern	59
Tabelle 9:	Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen regulatorischen Fragmenten von <i>GL1</i>	68
Tabelle 10:	Trichomanzahlen der Pflanzen 35S::GeBP, 35S::GL1 und GT6658 und ihrer Kreuzungen (F1) auf den ersten vier Rosettenblättern (n=20)	75
Tabelle 11:	Kombination der Promotorfragmente mit der <i>GL1</i> -cDNA in den zugehörigen Konstrukten zur Rettung der <i>gll</i> Mutante	77
Tabelle 12:	Maximale Trichomzahlen der transgenen <i>gll</i> Pflanzen mit den Konstrukten 169 bis R171, pGL2::GL1, pATML1::GFP::GL1, und der Kontrolle <i>Ler</i> auf den ersten, vier Rosettenblättern.....	78
Tabelle 13:	Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen 5'-Promotorfragmenten und des 3'-Bereichs von <i>WER</i>	90
Tabelle 14:	Übersicht der verschiedenen Kombinationen transient transformierter 35S-Konstrukte von Pflanzen mit TRY::GUS-, R80, R81 und R82.....	113
Tabelle 15:	Kombination der Promotorfragmente mit der <i>TRY</i> -cDNA in den zugehörigen Konstrukten zur Rettung der <i>try</i> Mutante	116
Tabelle 16:	Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente der Promotorfragmente Pr15 des <i>TRY</i> -Gens und Pr17 des <i>CPC</i> -Gens	132
Tabelle 17:	Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente der regulatorischen Bereiche der Gene <i>WER</i> , <i>GL1</i> , <i>AtMYB23</i> , <i>GL2</i> und <i>AtML1</i>	137
Tabelle 18:	Übersicht über die Größe der in <i>E. coli</i> exprimierten Fusionsproteine der Muster-bildungsgene	138
Tabelle 19:	Übersicht über die Größe der in <i>Arabidopsis</i> überexprimierten Fusionsproteine der Musterbildungsgene	141
Tabelle 20:	Verwendete Oligonukleotide.....	201

Tabelle 21:	Benutzte Oligonukleotide für die 5'-RACE des Gens GL1	211
Tabelle 22:	Liste der amplifizierten, nicht-kodierenden 3'-Fragmente.....	213
Tabelle 23:	Liste der Linker als Promotorfragmente	214
Tabelle 24:	Liste der cDNA-Entry-Klone ohne Stopp-Kodon	216
Tabelle 25:	Liste der amplifizierten Promotorfragmente für die BP-Reaktion.....	216
Tabelle 26:	Liste der durch LR-Reaktion rekombinierten GUS-Konstrukte	220
Tabelle 27:	Liste der durch LR-Reaktion rekombinierten Rettungskonstrukte	222

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
35S	35S -RNA-Gen des CaMV
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABRC	ABA responsive complex
ABRE	ABA responsive element
AGL	<i>AGAMOUSLIKE</i>
AP	Alkaline Phosphatase
<i>AtML1</i>	<i>Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1</i>
<i>AtMYB23</i>	<i>Arabidopsis thaliana MYB23</i>
attB	Attachment Site B
attL	Attachment Site L
attP	Attachment Site P
attR	Attachment Site R
B1	BHLH Protein aus <i>Zea mays</i>
bHLH	Basic/ Helix-Loop-Helix -Motiv
bidest.	bidestilliert
BP	Gateway BP -Rekombination
bp	Basenpaar
BTA	Basaler Transkriptionsapparat
bZIP	Basic / Leucin-Zipper -Motiv
bzw.	beziehungsweise
C1	MYB-Protein aus <i>Zea mays</i>
CAB	Chlorophyll a/b Binding Protein
CaMV	C auliflower (Blumenkohl)- M osaik- V irus
ccdB	C oupled C ell D ivision, Cytotoxisches Protein, potentes Gift der DNA-Gyrase
cDNA	c omplementary D N A
Col	Columbia Ökotyp
<i>CPC</i>	<i>CAPRICE</i>
CTAB	Hexadecaltrimethylammoniumbromide
d.h.	das heißt
DDC	D uplication- D egeneration- C omplementation
DNA	D esoxy r ibonucleinsäure (a cid)
DOF	DNA-Binding with One-Finger
DRE	D rought r esponsive e lement
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethylmethylsulfonat
EMSA	Electrophoretic m obility shift a ssay
Endo16	E ndodermispezifisches Gen aus Seeigel
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> [Lat.]
<i>ETC</i>	<i>ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE</i>
F1	Erste Generation nach der Kreuzung
F2	Zweite Generation nach der Kreuzung
for	Vorwärtsorientierung eines Promotorfragments bezogen auf die <i>in Vivo</i> -Richtung
GA	Gibberelline
<i>GAI</i>	<i>GA-INSENSITIVE</i>
GARC	GA responsive complex
GARE	GA responsive element
<i>GeBP</i>	<i>GLABRA1 ENHANCER BINDING PROTEIN</i>

GFP	Green Fluoreszent Protein
<i>GL1</i>	<i>GLABRA1</i>
<i>GL2</i>	<i>GLABRA2</i>
<i>GL3</i>	<i>GLABRA3</i>
GLUB1	Endo-1,3-beta-D-Glucanase
GRAS	<i>GAI</i> , <i>RGA</i> , <i>SCR</i> (ursprünglich identifizierte Gene der Familie)
GUS	β-Glucuronidase
GW	Gateway
h	Stunde
HA	Dreifachepitop für H emagglutinin
HD-ZIP	H omeodomäne- Z ipper-Motiv
i.e.	id est
IPTG	I sopropyl-β-D- T hiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i> Ökotyp
<i>LFY</i>	<i>LEAFY</i>
LR	Gateway LR-Rekombination
LRR-RLK	L eucine- R ich R epet R eceptor- L ike Protein K inase
LTRE	L ow t emperature r esponsive e lement
M	molar
MADS	<i>MCMI</i> , <i>AG</i> , <i>DEFA</i> , <i>SRF</i> (ursprünglich identifizierte Gene der Familie)
MEME	M ultiple E m for M otif E licitation http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html
min	Minute
MOD	M odul
mRNA	m essenger R NA
MS	M urashige- S koog-Salze
MSAR	M urashige- S koog-Salze- A gar- A gar
MYB	<i>v-myb</i> ist ein virales Gen, Bestandteil des M yeloblastosis V irus, <i>c-myb</i> ist ein Protoonkogen
MYC	<i>myc</i> ist ein virales Gen, Hühner-Virus MC29, führt zur M yelocytomatose
Ni-NTA	N ickel- N itrilotriaceticacid
nos	N opaline-Synthase
N-terminal	Aminoterminal
OD	O ptische D ichte
P	MYB-Protein aus <i>Zea mays</i>
Pac	Paclobutrazol
PAGE	P olyacrylamid G elelektrophorese
PARB	P ANGUS- R ekombinationskassette- B asta
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	P olymerase C hain R eaction
PLACE	P lant C is-Acting R egulatory D N E lements http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/
Pr	Rekombinierter Entry-Vektor mit einem P romotorfragment
prox	proximal
R	R ekombiniertes Promotorkonstrukt in PARB oder seinen Derivaten
RACE	R apid A mplification of c DNA E nds
RBCS	R ibulose-1,5- B isphosphate C arboxylase/ O xygenase S mall S ubunit
<i>RD22</i>	<i>RESPONSIVE TO DEHYDRATION 22</i>
rev	Rückwärtsorientierung eines Promotorfragments bezogen auf die <i>in Vivo</i> -Richtung
<i>RGA</i>	<i>REPRESSOR-OF-GAI-3</i>
<i>RGL</i>	<i>REPRESSOR-OF-GAI-LIKE</i>

RNA	R ibonucleinsäure (a cid)
RNase	RNAase
rpm	r ounds p er m inute
RT	R aumtemperatur
RT-PCR	R ea T ime- P olymerase C hain R eaction
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SA	Salicylsäure
SCM	<i>SCRAMBLED</i>
SDS	Sodium- D odecylsulfat
SEM	S canning E lectron M icroscopy
SSC	S tandard S aline C itrate
T1	Erste Generation nach der Transformation
T2	Zweite Generation nach der Transformation
T-DNA	T ransfer- D N A
TE	T ris/ E DTA-Puffer
TIS	T richom i nitiationsstelle
TRY	<i>TRIPTYCHON</i>
TT	<i>TRANSPARENT TESTA</i>
TTG1	<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA1</i>
TTG2	<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA2</i>
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	u ntranslatierte R egion
vgl.	vergleiche
VP1	<i>VIVIPAROUS 1</i>
W-Box	W RKY-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle
WER	<i>WEREWOLF</i>
WOX	W USCHEL homeobox
WRKY	WRKY-Motiv
WS	Wassilewskaja
WUS	<i>WUSCHEL</i>
X-Gluc	5'-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β -glucuronsäure

1. EINLEITUNG

Die Entwicklung von Pflanzen, wie auch von allen anderen multizellulären Organismen, hängt von der genauen Spezifizierung bestimmter Zelltypen ab. Woher „weiß“ eine Zelle, ob sie sich differenzieren soll oder nicht, und wie wird dieser Prozess kontrolliert? Wie kann ein Feld von gleichen Zellen ungleich und gemustert werden, wenn noch keine räumliche Information zugrunde liegt? Wie findet also *de novo* Musterbildung statt? - Dies sind wichtige Fragen der Entwicklungsbiologie, die auch dieser Arbeit zugrunde gelegt wurden.

Entwicklungsbiologische Entscheidungen werden meistens durch Hierarchien von Transkriptionsfaktoren reguliert, die letztendlich die Expression der Gene, die für die Determination verantwortlich sind, kontrollieren. Die finale Entscheidung, ob eine Zelle in eine bestimmte Differenzierung eintritt, hängt allerdings auch von dem entwicklungsbiologischen Kontext des Gewebes ab, in dem sie sich befindet.

In Pflanzen dienen zwei Modellsysteme dazu, die Ausbildung eines zweidimensionalen Musters zu untersuchen: die Blatthaare (Trichome; *trichos* griechisches Wort für Haare) und die Wurzelhaare der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die beide einzellig sind (Hülkamp, 2004; Hülkamp *et al.*, 1994; Hülkamp *et al.*, 1999; Larkin *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 1997a; Larkin *et al.*, 1997b; Larkin *et al.*, 1994; Marks, 1997; Schiefelbein, 2003; Szymanski *et al.*, 2000). Die Musterbildung findet jeweils in der epidermalen Oberfläche statt, womit sie für die Untersuchungen zur Zelltyp-Spezifizierung einfach zugänglich ist. Da Trichome und Wurzelhaare nicht essentiell für das Überleben der Pflanze sind, können diese Differenzierungssysteme sehr gut für genetische und molekularbiologische Untersuchungen herangezogen werden (Hülkamp *et al.*, 1994; Schiefelbein, 2003). Trichome entwickeln sich auf jungen Blättern in einem regulären, räumlichen Muster. Dieses Muster ist nicht zufällig aber auch nicht klonalen Ursprungs (Larkin *et al.*, 1996; Schnittger *et al.*, 1999). Die Musterbildung der Wurzelhaare scheint auf den ersten Blick anders zu funktionieren, da ein Zellreihenmuster etabliert wird, das durch die Position der unterliegenden Kortezellen festgelegt ist (Berger *et al.*, 1998a; Dolan *et al.*, 1994). Aber erstaunlicher Weise konnte gezeigt werden, dass die Regulatoren in beiden Systemen nahezu identisch sind, so dass ein gemeinsamer Musterbildungsmechanismus zugrunde gelegt werden kann. Diese Faktoren der Musterbildung zeigen im jeweiligen Organ und Gewebe, d.h. der Blattepidermis bzw. der Wurzelepidermis, das gleiche Expressionsmuster. Daraus resultieren Fragen, die in dieser Arbeit bearbeitet werden sollen.

Wird die Expression der Musterbildungsfaktoren auf die gleiche Art und Weise reguliert? Konkreter: Unterliegen die Aktivatoren und die Inhibitoren bzw. über- und untergeordnete Faktoren der gleichen Regulation? Gibt es einen Trichom- oder Wurzelhaar spezifischen Promotor? Werden

homologe Gene in einem Gewebe durch denselben Regulationsmechanismus gesteuert? Ist für homologe Gene in unterschiedlichen Organen ein vergleichbarer Regulationsmechanismus zugrunde gelegt? Wie werden komplexe intrinsische und extrinsische Signale für die Musterbildung verarbeitet?

1.1 Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung

1.1.1 Das epidermale Muster der Trichome und der Wurzelhaare

Die „Standardentwicklung“ der Epidermiszelle im Blatt führt zur epidermalen Puzzlezelle, während das Trichomschicksal gesondert initiiert wird, hingegen repräsentiert die Wurzelhaarzelle den epidermalen Grundzustand in der Wurzel (Masucci *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1998a), so dass Trichom und Nicht-Wurzelhaar zu homologisieren sind.

Trichome befinden sich auf Rosettenblättern, Hochblättern, der Sprossachse und den Sepalen bei *Arabidopsis thaliana*. Auf den ersten Rosettenblättern sind nur die adaxialen Oberflächen mit Trichomen versehen und später können auch abaxiale Trichome vorgefunden werden (Chien und Sussex, 1996). Auf den Rosettenblättern sind die Trichome vorwiegend drei-verzweigt (Hülkamp *et al.*, 1994; Marks, 1997; Marks *et al.*, 1991). Blatt-Trichome sind regelmäßig über die Blattoberfläche verteilt, und wie statistische Untersuchungen ergeben haben, ist das Abstandsmuster der Trichome zueinander nicht zufällig (Larkin *et al.*, 1996), denn in der Initiationszone befindet sich jedes Trichom im minimalen Abstand von drei bis vier Zellen zum nächsten (Hülkamp *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 1996), so dass ein einfaches zweidimensionales Muster vorliegt. Die Initiation der Trichome findet nicht gleichzeitig statt, sondern sie vollzieht sich in einer Welle über die epidermale Oberfläche, die an die progressive Blattentwicklung gekoppelt ist. Die ersten Trichome bilden sich an der Spitze des ersten Blattprimordiums aus, wenn es eine Länge von ungefähr 100 μm erreicht hat (Larkin *et al.*, 1996). So wie die Trichome an der Spitze reifen, schreitet die Initiation der Trichome in basipetaler Richtung fort. In Col Hintergrund werden außerdem neue Trichome zwischen bereits differenzierten Trichomen gebildet, die sich bereits durch mehrere epidermale Zellteilungen voneinander entfernt haben (Marks, 1997). Die Trichomdichte kann durch extrinsische und intrinsische Signale verändert werden. Beispielsweise spielen Temperatur, Photoperiode oder Gammastrahlung, sowie die Phytohormone Gibberelline, Jasmonsäure und Salicylsäure eine Rolle (Chien und Sussex, 1996; Nagata *et al.*, 1999; Perazza *et al.*, 1998; Telfer *et al.*, 1997; Traw und Bergelson, 2003; Zhu *et al.*, 2004). Nicht alle Gewebe und Organe zeigen die gleiche Dichte oder Fähigkeit der Trichombildung. Ein Beispiel dafür ist die unterschiedliche Trichomdichte auf der ad- und abaxialen Epidermis in Abhängigkeit von der Blattfolge (Chien und Sussex, 1996; Telfer *et al.*,

1997).

Die Bildung eines Trichoms kann in sechs Phasen unterteilt werden, s. Abb. 1 (Szymanski, 2001):
 1) Eine Epidermiszelle expandiert isodiametrisch aus der Ebene der Epidermis. 2) Der Trichomstamm unterzieht sich einem polaren Zellwachstum bis zu einer Länge von 30 μm peripendikular zu der Blattoberfläche. 3) Das Trichom verzweigt sich sequentiell. 4) Der Trichomstamm expandiert und die Trichomäste wachsen mit einer abgerundeten Spitze aus. 5) Die Trichome expandieren mit spitz zulaufenden Ästen. 6) Das Zellwachstum hat aufgehört und die Oberfläche des Trichoms wird papillär.

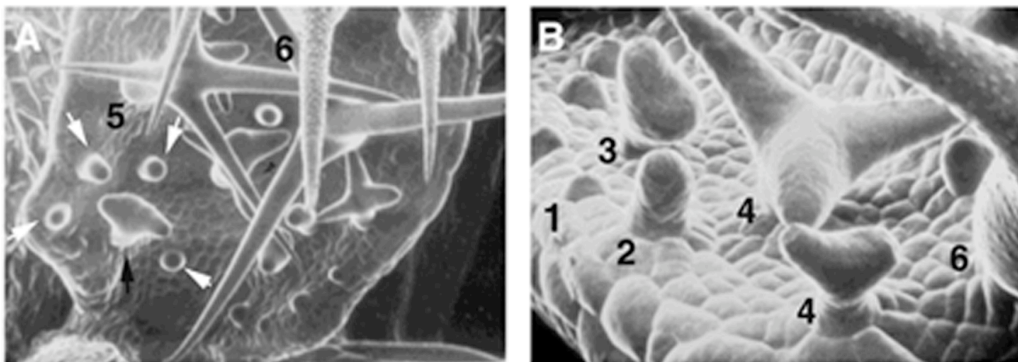


Abbildung 1 Phasen der Trichomentwicklung

SEM Aufnahme der adaxialen Oberfläche von *Arabidopsis* Blättern in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Zahlen zur linken Seite eines Trichoms weisen auf die jeweilige Entwicklungsphase des Trichoms hin (nach Szymanski, 2001).

In den Wurzeln höherer Pflanzen bilden einige der epidermalen Zellen lange, tubuläre Auswüchse aus, die Wurzelhaare. In *Arabidopsis thaliana* erscheint die Epidermis am Ende der meristematischen Zone, dort wo die Kalyptrazellen absterben, an der Wurzeloberfläche. Die epidermalen Zellen unterziehen sich einer schnellen Elongation und beginnen anschließend mit der Initiation der Wurzelhaare, wenn die Elongation aufhört (Dolan, 2001a). Bei *Arabidopsis* sind die Wurzelhaare in alternierenden, vertikalen Reihen angeordnet. Die epidermalen Zellen, die in Längsrichtung über den antiklinalen Wänden der Kortexzellen lokalisiert sind, entwickeln sich zu Wurzelhaaren, während sich die epidermalen Zellen über den periklinalen Wänden der Kortexzellen zu Nicht-Wurzelhaaren entwickeln (Berger *et al.*, 1998a). Vor dem Auswachsen der Wurzelhaare können die zukünftigen Haarzellen bereits von den Nicht-Haarzellen durch ihre höhere Zellteilungsrate (Berger *et al.*, 1998b), reduzierte Zelllänge (Dolan *et al.*, 1994; Masucci *et al.*, 1996), erhöhte zytoplasmatische Dichte (Dolan *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1994), reduzierte Vakuolisierung (Galway *et al.*, 1994) und Zelloberflächenmuster (Dolan *et al.*, 1994) unterschieden werden. Die Phytohormone Auxin und Ethylen besitzen einen Einfluss auf das epidermale Muster der Wurzel, ihre Wirkung auf die Wurzelhaar-Initiation setzt aber erst nach der initialen Musterbildung ein, d.h. wenn das Schicksal „Haarzelle“ bzw. „Nicht-Haarzelle“ schon bestimmt

wurde (Masucci und Schiefelbein, 1994; Tanimoto *et al.*, 1995). Phosphat und Eisen verändern das Muster der Wurzelhaare über den Ethylen-Weg (Schmidt und Schikora, 2001). Das Phytohormon Abscisinsäure ist bisher der einzige bekannte Faktor, der das Muster der Wurzelhaare unter speziellen Bedingungen früh beeinflussen kann (van Hengel *et al.*, 2004).

1.1.2 Faktoren des Musterbildung: Aktivatoren und Inhibitoren

Faktoren, die das Schicksal der Zellen positiv regulieren, werden „Aktivatoren“ genannt und entsprechend sind „Inhibitoren“ Faktoren, die einen negativ Einfluss ausüben.

Drei grundsätzliche Komponenten, die als Aktivatoren in den beiden Musterbildungssystemen auftreten, konnten bisher identifiziert werden: MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren, sowie ein WD40-Protein. Zusätzlich zu diesen Hauptkomponenten kann für den HD-ZIP-Transkriptionsfaktor *GLABRA2* (*GL2*) und den WRKY-Transkriptionsfaktor *TRANSPARENT TESTA GLABRA2* (*TTG2*) aktivierende Funktion vermutet werden (Johnson *et al.*, 2002; Masucci *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1998a).

Die MYB-Transkriptionsfaktoren weisen Strukturähnlichkeit zu den c-MYB-Protoonkogenen aus Tieren auf. Sie stellen eine Proteinfamilie dar, die die MYB-DNA-Bindungsdomäne besitzt. Die MYB-Domäne besteht aus bis zu drei nicht völlig identischen Wiederholungen (den Repeats R1, R2, R3), wobei jede ein Helix-Turn-Helix Motiv mit 53 Aminosäuren und drei gleichmäßig verteilten Tryptophan-Resten enthält. Im Gegensatz zu Tieren kann in Pflanzen eine Subfamilie ausgemacht werden, die durch die R2R3-Typ-MYB-Domäne charakterisiert wird. In *Arabidopsis thaliana* sind 126 MYB-Faktoren dieses Typs vorhanden, die in vielfältige regulatorische Prozesse involviert sind (Jin und Martin, 1999; Martin und Paz-Ares, 1997; Romero *et al.*, 1998; Stracke *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2004). Die in die Musterbildung involvierten, aktivierenden MYB-Transkriptionsfaktoren sind vom R2R3-Typ: *GLABRA1* (*GL1*) in der Trichom-Musterbildung (Oppenheimer *et al.*, 1991) und *WEREWOLF* (*WER*) in der Wurzelhaar-Musterbildung (Lee und Schiefelbein, 1999). Ihre MYB-Proteinfunktion ist austauschbar (Lee und Schiefelbein, 2001). Des Weiteren existiert ein homologer MYB-Faktor *AtMYB23*, der eine redundante Rolle in beiden Systemen übernimmt (Kirik *et al.*, 2005; Kirik *et al.*, 2001). Diese drei MYB-Faktoren stellen in der R2R3-MYB-Genfamilie einen eigenen, phylogenetischen Ast dar (Stracke *et al.*, 2001).

Die bHLH-Transkriptionsfaktoren repräsentieren ebenfalls eine Superfamilie mit 147 Genen in *Arabidopsis thaliana*. Sie können durch die bHLH-Domäne charakterisiert werden, die aus 60 Aminosäuren mit zwei funktional verschiedenen Teilen besteht. Zum einen befindet sich eine 15 Aminosäure lange, basische Region am N-Terminus und ist an die DNA-Bindung involviert. Am C-Terminus der Domäne ist eine Helix-Loop-Helix (HLH)-Region lokalisiert und übernimmt die Funktion der Dimerisierung (Bailey *et al.*, 2003; Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Für

das Trichom- sowie für das Wurzelhaar-Musterbildungssystem spielen die homologen Gene *GLABRA3* (*GL3*) und *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) die wichtige Rolle (Bernhardt *et al.*, 2003; Bernhardt *et al.*, 2005; Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003).

Für die WD40-Proteine wird angenommen, dass sie an Protein-Protein-Interaktionen teilnehmen und keine Transkriptionsfaktoren darstellen. Das Gen *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* (*TTG1*, früher *TTG*), gehört zu dieser Proteingruppe. (Dolan *et al.*, 1998; Galway *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2003; Lin und Schiefelbein, 2001; Walker *et al.*, 1999). Seine phänotypischen Effekte in der Funktionsverlust-Mutante sind pleiotropisch, so dass nicht nur die Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung betroffen sind, sondern auch die Anthocyan- und Thanin-Biosynthese (Koornneef, 1981; Zhang *et al.*, 2003).

GL2 kodiert für einen HD-ZIP-Transkriptionsfaktor (DiChristina *et al.*, 1996; Rerie *et al.*, 1994). Die HD-ZIP-Proteine gehören zu den Homeodomäne-Proteinen (HD). Die Homeodomäne ist 61 Aminosäure lang und generell in entwicklungsbiologische Prozesse in allen Eukaryoten involviert. Sie faltet sich in einer charakteristischen Drei-Helix-Struktur und interagiert mit der DNA. In Pflanzen gibt es viele HD-Familien. Eine wichtige Familie, die es nur in Pflanzen gibt, sind die HD-ZIP-Proteine. Sie besitzen zusätzlich C-terminal zu der Homeodomäne ein Leucin-Zipper-Motif (ZIP), über das Homo- oder Heterodimerisierung stattfindet (Tron *et al.*, 2004). HD-ZIP-Proteine sind in vier Untergruppen HD-ZIP I-IV eingeteilt worden (Sessa *et al.*, 1994). *GL2* gehört in die Untergruppe IV zusammen mit den Proteinen *AtML1* (*Arabidopsis thaliana MERISTEM LAYER 1*) und *PDF2* (*PROTODERMAL FACTOR 2*) (Abe *et al.*, 2003b; Abe *et al.*, 2001; DiChristina *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Sessions *et al.*, 1999).

TTG2 ist ein WRKY-Transkriptionsfaktor (Johnson *et al.*, 2002). Die WRKY-Transkriptionsfaktoren stellen ebenfalls eine große Proteingruppe mit über 100 Mitgliedern dar, die zumeist in der Pathogenantwort oder Seneszenz eine Rolle spielen. Der Name WRKY stammt von dem prominentesten Motiv der Proteine, die 60 Aminosäuren große WRKY-Domäne mit den konservierten Aminosäuren WRKYGQK und einem bis dahin unbekannten Zink-Finger ähnlichem Motiv am N-terminalen Ende. Die DNA-Bindung erfolgt präferentiell an einem spezifischem DNA-Motiv, die W-Box (Eulgem *et al.*, 2000). *TTG2* besitzt zwei WRKY-Domänen und eine C-terminale Domäne mit einer Zinkfinger-abhängigen Rolle (Johnson *et al.*, 2002; Rushton *et al.*, 1995). Diese Domäne zeigt Homologie zu dem *SPF1*-Gen aus Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*). *SPF1* bindet an die SP8-Sequenz der beta-Amylase- und Sporamin-Promotoren (Ishiguro und Nakamura, 1994), so dass *TTG2* möglicherweise auch über diese Domäne an DNA binden kann.

Außerdem wurde für die Wurzelhaar-Musterbildung vor kurzem das Gen *SCRAMBLED* (*SCM*) als wichtig identifiziert (Kwak *et al.*, 2004), da in der zugehörigen Mutante das positionsabhängige Muster der Wurzelhaare geändert ist. Das Gen *SCM* kodiert für eine Rezeptor-Proteinkinase (LRR-

RLK, leucine-rich repeat receptor-like protein kinase).

Die negativen Faktoren der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung werden alle zu einer Gruppe von homologen MYB-Transkriptionsfaktoren des R3-Typs zugeordnet, d.h. sie besitzen nur die letzte Repeat-Region. Außerdem tragen sie keine Aktivierungsdomäne. Zum einen zählen dazu *CAPRICE* (*CPC*) und *TRIPTYCHON* (*TRY*), wovon *CPC* für die Wurzel und *TRY* für die Trichome identifiziert wurde. Allerdings hat sich gezeigt, dass beide Faktoren in beiden Systemen eine partiell redundante Rolle übernehmen (Schellmann *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 1997). Des Weiteren übernehmen auch die homologen Gene *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE1* (*ETC1*) und *ENHANCER OF TRIPTYCHON AND CAPRICE2* (*ETC2*) eine zu *TRY* und *CPC* redundante Rolle bei der Musterbildung (Esch *et al.*, 2004; Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b).

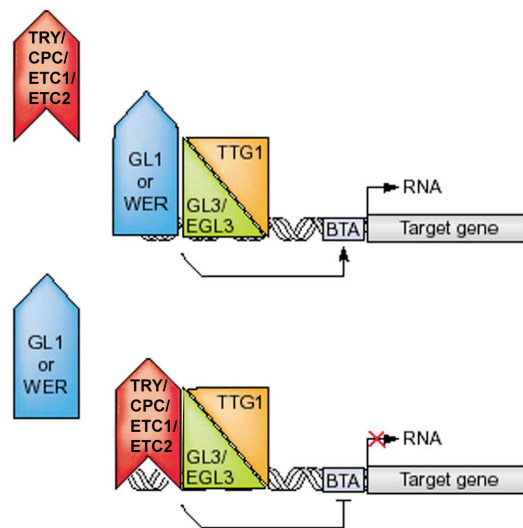


Abbildung 2: Postulierte Regulation durch die Transkriptionsfaktoren der Musterbildung.

TTG1, GL3, EGL3 und GL1 bzw. WER werden als Komponenten des Aktivator-Komplexes angenommen, der an die Promotorregion der Zielgene bindet und deren Transkription aktiviert. TRY, CPC, ETC1 und ETC2 konkurrieren mit GL1 bzw. WER um die Bindung an GL3 oder EGL3 in dem Komplex. Durch deren Bindung bindet der Komplex nicht mehr an die DNA oder ist nicht mehr in der Lage die Transkription zu aktivieren. BTA ist der basale Transkriptionsapparat (verändert nach Pesch und Hülskamp, 2004).

Da alle hier vorgestellten Gene, außer *TTG1* und *SCM*, für Transkriptionsfaktoren kodieren, kann angenommen werden, dass die Regulation der Musterbildung auch auf der transkriptionellen Ebene stattfindet. Hefe Zwei-Hybrid-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Aktivatoren (GL1/WER, GL3, EGL3, TTG1) einen Proteinkomplex bilden könnten (Bernhardt *et al.*, 2003; Esch *et al.*, 2003; Lee und Schiefelbein, 1999; Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003) so dass der Aktivator-Komplex an die Promotoren der Zielgene bindet und deren Transkription aktivieren könnte (s. Abb. 2). Hefe-Ein- sowie Drei-Hybrid-Analysen konnten zeigen, dass der Inhibitor TRY oder CPC dem entgegen wirkt (Esch *et al.*, 2003; Koshino-Kimura *et al.*, 2005). Der Inhibitor könnte folglich mit den Proteinen GL1 oder WER um die Bindung an den Aktivator-Komplex kompetitieren, und so die Bindung, oder die Aktivierung durch den Komplex verhindern (s. Abb. 2).

1.1.3 Phänotyp der Mutanten der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildungsfaktoren

Die Analyse der Funktionsverlust-Mutanten der Aktivatoren der Musterbildung ergibt ein einheitliches Bild. Sowohl der Funktionsverlust der Gene *GL1* als auch *TTG1* führt zum Verlust fast aller Trichome auf den Blättern (Koornneef, 1981; Koornneef *et al.*, 1982), nur einige Trichome bleiben am Rand später Rosettenblätter. Ebenso bedingt die Abwesenheit von *WER* und *TTG1* in der Wurzel eine stark erhöhte Wurzelhaarproduktion in den Nicht-Wurzelhaar-Reihen (Galway *et al.*, 1994; Lee und Schiefelbein, 1999). Der Funktionsverlust von *GL3* in Kombination mit *EGL3* führt zum Verlust aller Trichome, allerdings vermittelt der alleinige Verlust von *GL3* nur eine moderate Reduktion der Trichomanzahl. Der Verlust von *EGL3* allein hat keine Auswirkungen auf die Trichomininitiation (Koornneef *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 2003). In der Wurzel verursacht der Verlust von *EGL3* oder *GL3* keine Veränderung in der Region nahe der Wurzelspitze, jedoch werden mehr Wurzelhaare in der höheren Wurzelregion gebildet, die sich nahe am Wurzel-Hypokotyl-Übergang befindet. In der Doppelmutante *gl3 egl3* ist sowohl im unteren, als auch im oberen Teil der Wurzel ein Anstieg in der Anzahl der Wurzelhaare zu beobachten (Bernhardt *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Eine Mutation in *TTG2* oder *GL2* führt zu einer Reduktion der Trichomanzahl und einem Anstieg der Wurzelhaare in den Atrichoblasten-Reihen (DiChristina *et al.*, 1996; Johnson *et al.*, 2002; Masucci *et al.*, 1996).

Der Verlust des Inhibitors *TRY* führt zur Initiation von zwei bis drei Trichomen nebeneinander, sogenannte Nester (Cluster), und eine erhöhte Anzahl von Verzweigungen wird ausgebildet. In der Wurzel kann hingegen keine Veränderung festgestellt werden (Schellmann *et al.*, 2002). Der Verlust des *CPC*-Gens führt zu einer starken Reduktion der Wurzelhaare (Wada *et al.*, 1997), und auf dem Blatt sind deutlich mehr Trichome festzustellen, allerdings ohne die Nestfrequenz erhöht zu haben (Schellmann *et al.*, 2002). Der Verlust beider Gene in der Doppelmutante *cpc try* führt zu einer drastischen Verstärkung des Phänotyps beider Einzelmутanten, d.h. es werden deutlich größere Trichomnester auf den Blättern gebildet und die Wurzeln sind fast komplett haarlos (Schellmann *et al.*, 2002). Der zusätzliche Verlust der anderen homologen Gene *ETC1* und *ETC2* führt zu einer weiteren Verstärkung des Phänotyps der Doppelmutante *cpc try* (Kirik *et al.*, 2004a; Kirik *et al.*, 2004b).

1.1.4 Ein gemeinsames Modell für die Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung

Um zu erklären, wie aus einem uniformen Feld von Zellen der Blattepidermis ein regelmäßiges Trichom-Muster etabliert wird, wurde ein Modell entwickelt. In diesem Modell wird angenommen, dass die Zellen zu Beginn der Musterbildung miteinander um das Trichomschicksal konkurrieren und sich gegenseitig inhibieren. Später inhibieren die sich entwickelnden Trichome das Trichomschicksal in den benachbarten Zellen (Hülkamp und Schnittger, 1998; Larkin *et al.*, 2003;

Schnittger *et al.*, 1999; Szymanski *et al.*, 2000). Grundlage sind interagierende, regulatorische Rückkopplungsschleifen (Feedback Loops) der Aktivatoren und der Inhibitoren. Theoretische Simulationen haben aber gezeigt, dass dies nicht ausreicht eine *de novo*-Musterbildung zu erklären, weshalb Kriterien wie lokale Selbstverstärkung in Kombination mit lateraler Inhibition postuliert wurden (Meinhardt und Gierer, 1974, 2000). Damit gelten als Prinzipien: Der Aktivator aktiviert den Aktivator. Der Aktivator aktiviert den Inhibitor. Der Inhibitor reprimiert den Aktivator. Der Inhibitor kann sich im Gegensatz zum Aktivator lateral schneller bewegen als dieser. (Pesch und Hülskamp, 2004).

Das Modell wurde dann auf die Wurzelhaar-Musterbildung übertragen (Lee und Schiefelbein, 2002). Unterschied zwischen den beiden Systemen ist, dass die ursprüngliche Initiation der Trichom-Musterbildung durch zufällige Fluktuation der Konzentrationen der Musterbildungsproteine hervorgerufen wird, während in der Wurzelepidermis ein angenommenes Signal aus dem Kortex in den Musterbildungsmechanismus mit einfließt. Eine schematische Darstellung für den Mechanismus in der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung kann Abb. 3 entnommen werden.

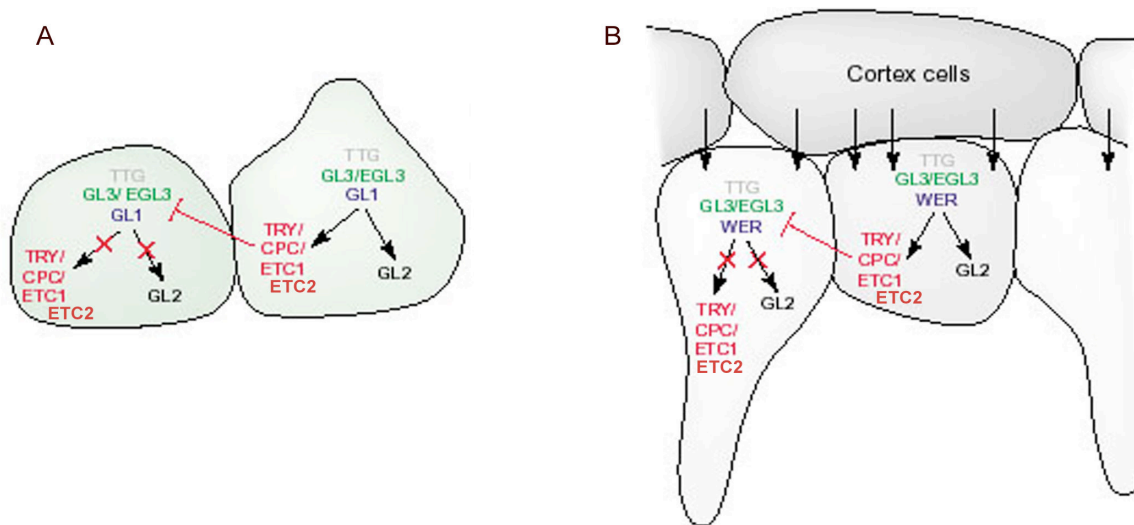


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen den Musterbildungsfaktoren in relativ spätem Stadium.

In (A) sind Trichom und Nachbarzelle und in (B) Nicht-Wurzelhaarzelle und Wurzelhaarzelle mit darüber liegenden Kortexzellen dargestellt. Die rechte Zelle ist jeweils bereits spezifiziert für Trichom- bzw. Nicht-Wurzelhaar-Schicksal. Der Aktivator-Komplex bestehend aus TTG1, GL3 und EGL3, sowie GL1 bzw. WER aktiviert das GL2-Gen und die Gene der Inhibitoren TRY, CPC, ETC1 sowie ETC2. (Hier nicht dargestellt ist die mutmaßliche Selbstaktivierung des Aktivators.) Die Inhibitoren bewegen sich lateral in die Nachbarzelle und hemmen die Aktivität des Aktivators und damit die Spezifizierung zum Trichom bzw. Nicht-Wurzelhaar. In der Wurzelepidermis unterliegt ein bisher unbekanntes Signal aus dem Kortex dem Musterbildungsmechanismus. Proteine mit derselben Funktion sind in derselben Farbe gezeigt (verändert nach Pesch und Hülskamp, 2004).

1.1.5 Expression der Gene, die an der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung beteiligt sind

Entsprechend dem Modell für die Musterbildung konnte durch die GUS- und *in Situ*-Expressionsstudien der Musterbildungsfaktoren nachgewiesen werden, dass die Lokalität der Expression der Aktivatoren und Inhibitoren übereinstimmt.

Die Expression der Faktoren, die an der Trichom-Musterbildung beteiligt sind, kann für die Gene *GL1* (Larkin *et al.*, 1993), *GL3* (Zhang *et al.*, 2003), *EGL3* (Zhang *et al.*, 2003), *TTG1* (Baudry *et al.*, 2004; Bouyer, 2004), *GL2* (Szymanski *et al.*, 1998a) und *TTG2* (Johnson *et al.*, 2002) so beschrieben werden, dass sie in den jungen Blättern in der ganzen Blattepidermis und in den sich bildenden Trichomen sehr stark zu sehen ist. Mit zunehmendem Alter der Blätter konzentriert sich die Expression immer mehr auf die Trichome, und in der Blattepidermis wird die Expression von der Spitze zur Basis reduziert. Die Expression der Gene *TRY* und *CPC* zeigen dasselbe Muster (Schellmann *et al.*, 2002).

In der Wurzelepidermis kann die Expression der Gene *WER* (Lee und Schiefelbein, 1999), *GL2*, *TTG2* (Johnson *et al.*, 2002) und *CPC* (Wada *et al.*, 2002) in den Atrichoblasten-Reihen detektiert werden. *TRY*-Expression kann nur in der Doppelmutante *cpc try* der Wurzel in gefleckten Muster detektiert werden, da das Reihemuster hier aufgehoben ist (Schellmann *et al.*, 2002). *GL3* und *EGL3* werden hingegen präferentiell in den Wurzelhaarzellen exprimiert und das Protein wandert in die Nicht-Wurzelhaarzellen (Bernhardt *et al.*, 2003; Bernhardt *et al.*, 2005). Vorhergesagte feine Unterschiede in Konzentration und zeitlichem Muster lassen sich allerdings über GUS- und *in Situ*-Experimente kaum nachweisen.

1.2 Regulation der Transkription

Die Expression eines Gens kann durch viele Prozesse, z. B. transkriptionelle Regulation, DNA-Methylierung, Chromatin-Modellierung, RNA-Prozessierung, microRNA usw. reguliert werden. Da in dieser Arbeit ausschließlich die transkriptionelle Regulation untersucht wurde, wird im Folgenden ein Überblick über diese gegeben.

1.2.1 Generelle Prinzipien der transkriptionellen Regulation

Proteine, die in die Regulation der Transkription involviert sind, können in vier verschiedene funktionale Gruppen unterteilt werden:

1. die generellen Transkriptionsfaktoren, die den basalen Transkriptionsapparat bilden (BTA) und an den proximalen Kernpromotor binden
2. die Cofaktoren des BTA und andere Cofaktoren
3. Sequenzspezifische, DNA bindende Transkriptionsfaktoren
4. Chromatin-Remodellierungsfaktoren

Während die Komponenten des basalen Transkriptionsapparats unter den Eukaryoten sehr stark konserviert sind, haben sich gerade die Cofaktoren und die Transkriptionsfaktoren stark divergent entwickelt. Die Funktionsweise des basalen Transkriptionsapparats, der die Initiation der Transkription vollzieht, wird hier nicht beschrieben. Die Cofaktoren stellen eine heterogene Gruppe dar. Eine Kategorie der Cofaktoren interagiert mit den Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren und moduliert deren DNA-Bindung oder deren Interaktion mit dem BTA, während eine andere Kategorie als modulärer Adapter für die Initiation der Transkription dient. Die Chromatin-Remodellierungsfaktoren können die Histone kovalent modifizieren und die Chromatinstruktur reorganisieren, so dass die Gene für die Transkription zugänglich werden.

Sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren, zu denen fast alle Regulatoren der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung zu zählen sind, werden gewöhnlich als Proteine definiert, die DNA binden und in der Lage sind die Transkription zu aktivieren oder zu reprimieren. Sie sind oft für die selektive Expression von Genen verantwortlich und werden selbst in gewebe-, zelltyp-, zeit- oder reizabhängiger Weise exprimiert. Ihre Proteinstruktur ist meist modular, mit einer DNA-bindenden Domäne und einer Effektordomäne. Sie können untereinander, mit den Cofaktoren, direkt mit dem BTA und mit den Chromatin-Remodellierungsfaktoren interagieren. Transkriptionsfaktoren binden über ihre DNA-bindende Domäne an konservierte DNA-Sequenzen, die cis-regulatorischen Elemente, die meistens 5 bis 20 Nukleotide beinhalten (Rombauts *et al.*, 2003).

Im *Arabidopsis* Genom kodieren mehr als 5% der Gene für Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000). Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren können in Familien zusammengefasst werden, die aufgrund ihrer DNA-Bindungsdomäne kategorisiert werden (Pabo und Sauer, 1992). Durch die progressive Analyse des *Arabidopsis* Genoms werden jedoch immer noch neue Klassen von Transkriptionsfaktoren charakterisiert (Boggon *et al.*, 1999; Kagaya *et al.*, 1999; Kawaoka *et al.*, 2000; Nagano *et al.*, 2001; Schauser *et al.*, 1999; Windhövel *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2005; Zourelidou *et al.*, 2002).

Die Spezifität der Gen-Expression wird in Eukaryoten durch Multiprotein-Komplexe vermittelt. Die Bildung dieser Komplexe beinhaltet die kombinatorische Aktion von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die an konservierte Promotorelemente binden. Bei der Zusammensetzung spielen folglich die Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen eine Rolle. Damit wird diese Art der transkriptionellen Regulation von Eukaryoten als kombinatorische Kontrolle bezeichnet (Wollberger, 1999).

Es gibt viele Beispiele für direkte Protein-Protein-Interaktionen von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana*. Eine Studie über synthetische Kernpromotoren zeigte, dass in Pflanzen die Kombination von verschiedenen Elementen zu einer besseren Induktionsfähigkeit führt (Rushton *et al.*, 2002). In Zusammenhang dieser Arbeit sind die vielen

Interaktionen von MYB-, bHLH-Faktoren und TTG1 von besonderem Interesse. Zum Beispiel regulieren TT2 (MYB), TT8 (bHLH), EGL3 (bHLH) und TTG1 die Expression des Gens *BANYLUS* und damit die Proanthocyanidin-Biosynthese (Baudry *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Eine gleiche Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren findet man auch für die Anthocyanin-Biosynthese in *Petunia hybrida* (Quattrocchio *et al.*, 1998; Spelt *et al.*, 2000). Interagierende MYB- und bHLH-Transkriptionsfaktoren sind zahlreich bekannt und ihre Austauschbarkeit und damit Spezifität der Interaktion wurde teilweise getestet (Zimmermann *et al.*, 2004). AtMYC2 und AtMYB2 als Regulatoren der Trockenstress- und Abscisinsäure-Antwort des Gens *RD22* stellen ein gut untersuchtes Beispiel für diese kombinatorische Kontrolle dar (Abe *et al.*, 2003a; Abe *et al.*, 1997). Die Interaktion der Proteine C1(MYB) und B (bHLH) ist ein weiteres prominentes Beispiel in *Zea mays* für eine solche MYB-bHLH-Interaktion (Hernandez *et al.*, 2004). Die funktionale Kombinatorik von MYB-, bHLH- und bZIP-Transkriptionsfaktoren spielen ebenfalls eine wichtige Rolle, wie die Untersuchung verschiedener Promotoren der Phenylpropoid-Biosynthese aus *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* gezeigt hat (Feldbrügge *et al.*, 1994; Feldbrügge *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 2005; Kircher *et al.*, 1998).

1.2.2 Modulärer Aufbau von regulatorischen Sequenzen

Ein Promotor kann in den Kernpromotor, der den Zusammenbau des BTAs ermöglicht, und weitere regulatorische Bereiche, die die Expression spezifizieren, unterteilt werden (Molina und Grotewold, 2005). In Tieren können sich die DNA-Bereiche, die die korrekte zeitliche und räumliche Regulation eines Gens liefern, über zehntausende von Basen ausdehnen (Bonifer, 2000). In Pflanzen sind diese regulatorischen Sequenzen meist kürzer. Im kompakten *Arabidopsis* Genom stehen der 5'- und 3'-Region im Mittel 2000 Basen zur Verfügung (ArabidopsisGenomeInitiative, 2000). Kompakte 5'-Promotoren liefern oft die Expression des nativen Gens, wie durch Reporter- und Komplementierungsanalysen gezeigt werden kann. Aber es können auch regulatorische Elemente in den 3'-Bereichen, den Introns und den 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTRs) gefunden werden ((Deyholos und Sieburth, 2000; Larkin *et al.*, 1993; Sieburth und Meyerowitz, 1997; Wang *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2001).

Transkriptionelle Regulation ist oft das Ergebnis von vielfältigen Einflüssen, d.h. die Regulation muss vielen Anforderungen genügen. Diese können in einem Promotor, oder besser gesagt in der regulatorischen Sequenz durch das Zusammenspiel verschiedener cis-regulatorischer Elemente vereinigt werden, um eine koordinierte Regulation zu ermöglichen (Arnone und Davidson, 1997; Davidson, 2001; Yuh *et al.*, 1998).

Die cis-regulatorischen Elemente sind in sogenannten Modulen organisiert, so dass die gesamte regulatorische Region eines Gens in Untereinheiten unterteilt werden kann. Jedes Modul besitzt

mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (vier bis acht), über die es verschiedene Inputs bekommt, und übernimmt damit eine, von vielen regulatorischen Funktionen (zeitlich und räumlich) innerhalb des gesamten, regulatorischen Spektrums eines Gens (Arnone und Davidson, 1997; Davidson, 2001; Fang *et al.*, 1989). Die Bindungsstellen eines Moduls können oft in nächster Umgebung vorgefunden werden. Eine Bindungsstelle für einen bestimmten Transkriptionsfaktor kann dabei mehrmals auftreten. Meistens müssen zwei oder mehrere Aktivatoren in einem Modul binden, um eine Aktivierung des Gens zu erzielen (AND-Logik). Aber jeder Faktor von den verschiedenen Faktoren, die in einem Modul binden, sollte ausreichend sein, um einen gewissen Output zu generieren (OR-Logik). Begrenzung der Expression, die durch ein Modul gesteuert wird, wird oft durch bindende Inhibitoren ermöglicht (NOT-Logik) (Howard und Davidson, 2004).

Damit kann ein Promotor als Informationsverarbeitungseinheit angesehen werden, indem der Output mit dem z.B. entwicklungsbiologischen Input „verdrahtet“ wird und zum BTA weitergeleitet wird, der an den proximalen Kernpromotor bindet (Arnone und Davidson, 1997; Davidson, 2001; Yuh *et al.*, 1998, 2001). Eine schematische Darstellung der Informationsverarbeitung kann Abb. 4 entnommen werden.

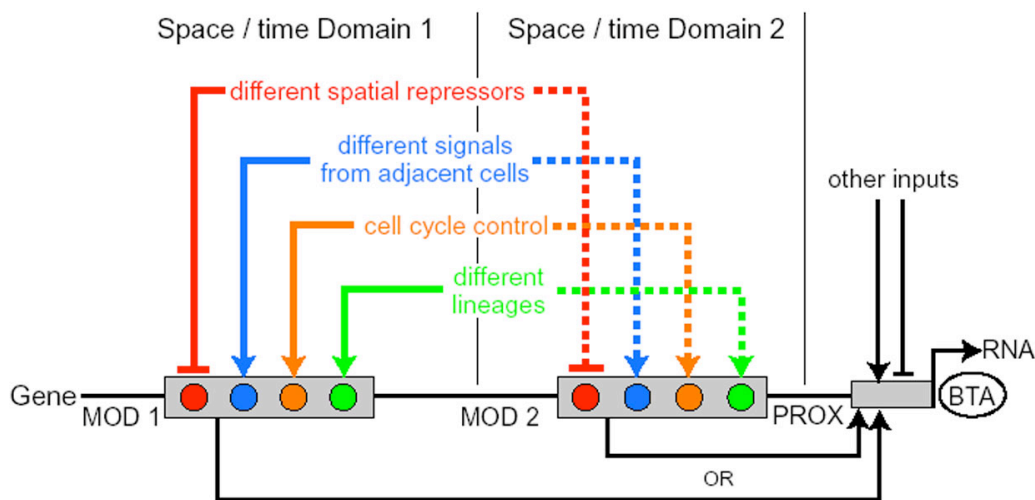


Abbildung 4: Moduläre, cis-regulatorische Informationsverarbeitung

Die Abbildung zeigt mehrere tausend Basen eines Promotors, der unter der Kontrolle von zwei Modulen steht (MOD1 und MOD2). Jedes arbeitet in einer bestimmten räumlichen und zeitlichen Domäne der Entwicklung. Jedes Modul empfängt parallele Inputs über diskrete cis-regulatorische Elemente von verschiedenen Signaltransduktionswegen [räumliche Inhibitoren (rote Pfeile), Signale von benachbarten Zellen (blaue Pfeile), Zellzykluskontrolle (orange Pfeile) und verschiedene Zelltypen, in denen das Gen generell aktiv ist (grüne Pfeile)] durch bindende Transkriptionsfaktoren, als Repressoren oder Aktivatoren. Die spezifischen Faktoren bzw. die Kombination der Faktoren ist für jedes Modul verschieden. Jedes Modul liefert seine Information an ein proximales Modul (PROX), das weitere Inputs erhalten kann und den Output an den BTA weiterleitet und zur regulierten Transkription führt. (aus Davidson, 2001).

Im tierischen Systemen ist der Promotor des *Endo16*-Gens von Seeigel die zur Zeit am besten untersuchte, regulatorische Sequenz und stellt ein hoch komplexes, regulatorisches Netzwerk dar (Yuh *et al.*, 2001).

Hoch modulare, regulatorische Systeme in Pflanzen sind bisher selten beschrieben worden, z.B. für den CaMV-35S-Promotor, den lichtregulierten Promotoren (*rbcs* und *cab*-Gene), den *LEAVY*-Promotor und den β -Phaseolin-Promotor (Benfey und Chua, 1990a; Blazquez und Weigel, 2000; Chandrasekharan *et al.*, 2003; Chattopadhyay *et al.*, 1998). Für den Wuschel-Promotor deutet sich ebenso eine modulare Regulation an (Bäurle und Laux, 2005).

1.3 Koexprimierte Gene und das Schicksal von duplizierten Genen

Für koexprimierte Gene wird erwartet, dass sie ähnliche regulatorische Elemente, die räumlich zusammenhängend lokalisiert sind, teilen, um eine Koregulation zu ermöglichen (Arnone und Davidson, 1997; Rombauts *et al.*, 2003). *TRY* und *CPC* könnten solche koregulierten Gene sein, da sie im gleichen Gewebe zur gleichen Zeit exprimiert werden und eine ähnliche Funktion übernehmen (Schellmann *et al.*, 2002). Für zwei Genfamilien (die für Proteine der gestreiften Muskulatur und Proteine von T-Zellen kodieren), die streng koreguliert sein sollten, wurde eine detaillierte vergleichende Analyse der cis-regulatorischen Elemente durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass das Set transkriptioneller Regulatoren, das für die Genfamilie definiert werden kann, vielen aber nicht allen Genen gemeinsam ist. Außerdem ist die Reihenfolge und die räumliche Anordnung in keinem Gen gleich einem anderen (Arnone und Davidson, 1997). Somit sollte dennoch das Vorkommen von gemeinsamen Elementen in koregulierten Genen häufiger sein als bei einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre. In *Arabidopsis thaliana* konnte dies z.B. für einige Gene der Phenylpropanoid-Biosynthese bestätigt werden (Hahlbrock *et al.*, 2003; Hartmann *et al.*, 2005).

Ebenso zeigt der Vergleich verschiedener Genome, dass die regulatorischen Elemente orthologer Gene, die dieselbe Funktion übernehmen, konserviert sind (Guo und Moose, 2003; Hong *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2001; McCue *et al.*, 2001), was die cis-regulatorische Analyse durch die Methoden des „Phylogenetic Footprinting“ für weit entfernte Verwandte (Gumucio *et al.*, 1992) und „Phylogenetic shadowing“ (Boffelli *et al.*, 2003) für nah verwandte Arten als Grundlage nimmt. In Pflanzen ist eine große Anzahl von duplizierten Genloci vorzufinden, die wahrscheinlich auf viele segmentale Duplikationen und Polyploidisierungen zurückzuführen sind (Moore und Purugganan, 2005; Simillion *et al.*, 2002). Gerade auch das Vorkommen von großen Transkriptionsfaktor-Genfamilien in *Arabidopsis thaliana* gibt Zeugnis dafür (Heim *et al.*, 2003; Parenicova *et al.*, 2003; Riechmann *et al.*, 2000; Riechmann und Ratcliffe, 2000; Stracke *et al.*, 2001; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003).

Wie sieht das Schicksal von duplizierten Genen aus? Genduplikationen tragen dazu bei, neue Genfunktionen zu etablieren. Früher wurde angenommen, dass bei einer Genduplikation eines der duplizierten Gene eine komplett neue Funktion (Neofunktionalisierung) übernimmt, oder sich zu

einem funktionslosen Pseudogen (Pseudogenisierung) entwickelt (Ohno, 1970). Mittlerweile ist aber klar geworden, dass positive Selektion eine entscheidende Rolle spielt, Genkopien zu erhalten und dies kann zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Genduplikation stattfinden (Moore und Purugganan, 2005). Diese Theorie wurde in dem Duplikation-Degeneration-Komplementationsmodell beschrieben (kurz DDC-Modell) (Force *et al.*, 1999; Lynch und Force, 2000). Damit ist das Schicksal duplizierter Gene oft in einer Subfunktionalisierung zu sehen, d.h. Subfunktionen des Ahnen-Gens werden geändert (Force *et al.*, 1999; Lynch und Force, 2000). Bei diesem Prozess können die kodierenden und/ oder die regulatorischen Regionen betroffen sein (s. Abb. 5).

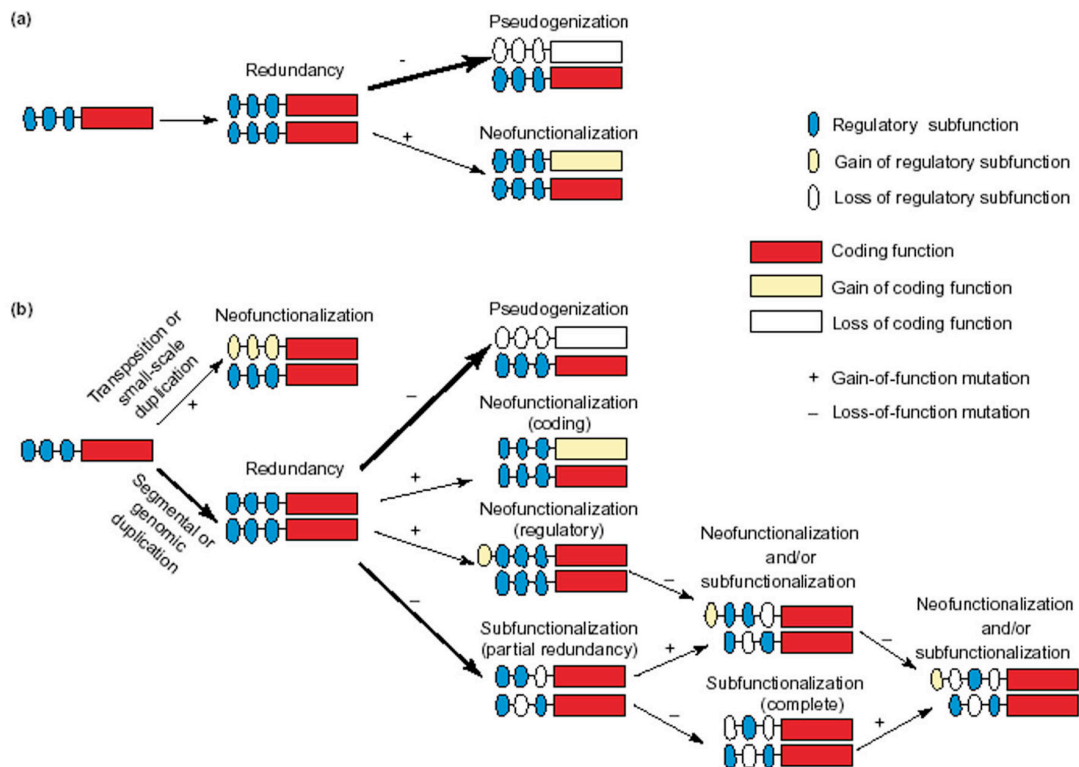


Abbildung 5: Vergleich des klassischen Ohno-Modells und des neuen DDC-Modells

(a) Das klassische Ohno-Modell duplizierter Gen-Schicksale beinhaltet Pseudogenisierung und Neofunktionalisierung der kodierenden Region. (b) Das aktuelle DDC-Modell beinhaltet neben Pseudogenisierung und Neofunktionalisierung zusätzlich Neofunktionalisierung und Subfunktionalisierung regulatorischer Subfunktionen und kodierender Regionen, sowie deren Kombination. Die Pfeilstärke kennzeichnet die relative Frequenz der möglichen Schicksale. (aus Moore und Purugganan, 2005)

Die Tatsache, dass die regulatorischen Element oft sehr kurze Sequenzen darstellen und damit durch Punktmutationen sehr schnell zerstört oder geschaffen werden können, unterstützt die These, dass Promotoren bevorzugte Orte der adaptiven Evolution duplizierter Gene sind (Edelman *et al.*, 1999). Oft sind gerade bei duplizierten Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, eher die Promotoren, als die kodierenden Regionen, die primären Orte für adaptive Evolution (Doebley und Lukens, 1998). Auch bei der Domestifikation von Teosinte zu Mais konnte für das *TBI*-Gen gezeigt werden, dass sich die Evolution in der regulatorischen Region und nicht in der Proteinsequenz

abspielt (Wang *et al.*, 1999). Diese Art der Diversifizierung innerhalb der regulatorischen Bereiche führt zu der Änderung des Expressionsmusters der Gene (Blanc und Wolfe, 2004; Carroll, 2000; Moore und Purugganan, 2005; Purugganan, 2000). Damit können zwei Expressionsdomänen der duplizierten Gene entstehen, die zusammen das Muster des Vorfahr-Gens widerspiegeln (Force *et al.*, 1999). Eine der Vorhersagen des DDC-Modells besagt, dass duplizierte Gene in der frühen, divergenten Entwicklung redundante Funktionen übernehmen können. Theoretische Überlegungen zeigen, dass partielle Redundanz den Übergang zu kompletter Subfunktionalisierung verzögern kann (Wagner, 1999, 2002).

Interessanter Weise sprechen gerade die vergleichbaren Regulatoren und die vergleichbare Funktionalität in den beiden Musterbildungssystemen (Trichom/ Wurzelhaar) für eine vergleichbare Evolution. *GL1* und *WER* bilden einen phylogenetischen Ast mit dem Gen *AtMYB23* in der Superfamilie der R2R3-MYB-Transkriptionsfaktoren, so dass sie als duplizierte Gene angenommen werden können (Dolan, 2001b; Kellogg, 2001; Lee und Schiefelbein, 2001; Stracke *et al.*, 2001). Ähnliches lässt sich auch für die beiden eng verwandten Gene *GL3* und *EGL3* (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003) innerhalb der bHLH-Superfamilie vermuten. Die Gene *TRY* und *CPC* könnten aufgrund ihrer Ähnlichkeit als R3-MYB-Proteine und ihrer redundanten Funktionen (Schellmann *et al.*, 2002) ebenfalls auf diese Weise entstanden sein.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die vergleichende, experimentelle Analyse der regulatorischen Bereiche der wichtigsten Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildungsgene: *GLABRA1* und *WEREWOLF* als zueinander homologe Repräsentanten der Aktivatoren, sowie *TRIPTYCHON* und *CAPRICE* als Inhibitoren. *GL1* und *WER* spielen entweder in der Trichom- oder in der Wurzelhaar-Musterbildung eine Rolle, übernehmen hier aber vergleichbare Funktion. *TRY* und *CPC* hingegen wurden ausgewählt, da jedes Gen seinen Schwerpunkt der Regulation in jeweils einem der beiden Systeme (Trichom/ Wurzelhaare) findet, jedoch auch überlappende Funktion nachzuweisen ist.

Erste Aufgabe war die regulatorischen Bereiche der Gene durch GUS-Reporter-Analyse und Rettungsstudien der Funktionsverlust-Mutanten auf minimale Regionen zu kartieren. Weitere Deletions- und Mutationsexperimente dieser regulatorischen Regionen wurden dazu genutzt, essentielle cis-regulatorische Elemente der jeweiligen minimalen regulatorischen Sequenz zu identifizieren. Durch *In-Vivo* Protein-DNA-Interaktionsstudien und genetische Untersuchungen wurden mögliche Transkriptionsfaktoren und –Komplexe als Regulatoren der hier untersuchten Gene *GL1*, *TRY* und *CPC* getestet. Die funktionale Homologie der regulatorischen Bereiche wurde durch Promotoraustausch-Experimente untersucht. Mit Hilfe der hier gewonnen Daten wurde eine vergleichende Analyse der homologen Aktivator-Gene *GL1* und *WER*, sowie der homologen

Inhibitor-Gene *CPC* und *TRY* ermöglicht, um die Frage nach der Regulation der Organ-, Gewebe- und Zellspezifität und die Vergleichbarkeit der homologen Gene zu beantworten. Der Vergleich der regulatorischen Bereiche von Aktivator und Inhibitor lieferte maßgebliche, neue Erkenntnisse über die Regulation der Musterbildung und Unterschiede in der Komplexität der Regulation von Aktivatoren im Gegensatz zu Inhibitoren.

2. ERGEBNISSE

Als generelles Verfahren zur Untersuchung der Promotoren wurde zum einen die Fähigkeit der Promotorfragmente getestet, das räumlich-zeitliche Expressionsmuster eines Promotors zu dirigieren. Dies wurde mit Hilfe des GUS-Reportergens untersucht. Zum anderen wurde die Funktionalität der vermittelten Expression für die Musterbildung getestet. Dazu wurden Rettungskonstrukte mit den jeweiligen Promotorfragmenten hergestellt und in die zugehörigen Funktionsverlust-Mutanten transformiert, um den wildtypischen Phänotyp durch die Expression der jeweiligen cDNA wieder herzustellen.

2.1 Herstellung eines neuen Expressionsvektors

2.1.1 PARB als Grundlage für die Fragmentanalyse von Promotoren

Für diese Arbeit wurde ein neuer Expressionsvektor hergestellt, da eine Vielzahl von Promotorfragmenten unabhängig von ihrem eigenen Kernpromotor getestet werden sollten.

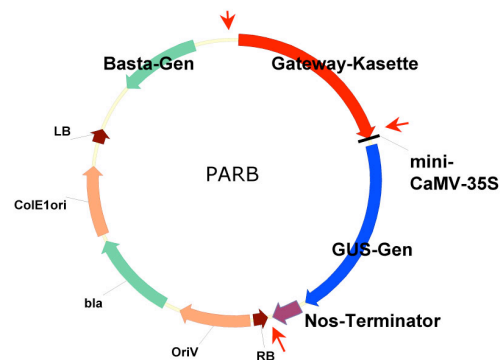


Abbildung 6: Graphische Darstellung des hergestellten Basis-Vektors PARB

(RB, LB = rechte und linke Grenze zur Rekombination des Plasmids mit dem Pflanzengenom. ColE1ori = Replikationsursprung für *E. coli*. OriV = Replikationsursprung für *Agrobacterium tumefaciens*). Bla = Gen für die Ampizillin-Resistenz. Die roten Pfeile deuten auf die möglichen Stellen hin, an denen weitere Promotorfragmente eingefügt werden können).

Dazu wurde der Vektor pANGUS gewählt, der das Gen für die β -Glucuronidase (GUS) unter die Kontrolle des 35S-Minimalpromotor (-46 bis +8) des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV-35S) stellt. Um eine schnelle und unkomplizierte Klonierung zu ermöglichen, sollte die Strategie des Gateway Klonierungssystems genutzt werden, die das Einfügen von DNA-Sequenzen über die Kombination der BP- und LR-Rekombination ermöglicht (s. 4.2.4). Dazu wurde die Gateway-Kassette mit attL-Rekombinationsstellen vor den Minimalpromotor fusioniert, so dass auf diese Weise ein „Destinationsvektor“ konstruiert wurde. Fast alle Promotorfragmente konnten über PCR amplifiziert, über BP-Reaktion in einen ENTRY-Vektor und dann über LR-Reaktion in den

Destinationsvektor kloniert werden. Für zusätzliche Untersuchungen konnten weiter Fragmente über Ligation vor und hinter die Gateway-Kassette, sowie hinter die cDNA des GUS-Gens kloniert werden. Des Weiteren konnte das GUS-Gen gegen andere kodierende Sequenzen ausgetauscht werden, so dass für transkriptionelle Untersuchungen sowie für Versuche zur Analyse der Rettungseffizienz auf dasselbe Vektor-Grundgerüst zurückgegriffen werden konnte.

Um einen hohen Durchsatz der mit diesem Vektorsystem transformierten Pflanzen zu gewährleisten, wurde die Kanamyzin-Resistenz des Ursprungvektors gegen die Basta-Resistenz ausgetauscht. Der entstandene Vektor wurde PARB (pANGUS-Rekombinationskassette-Basta) genannt (Abb. 6).

2.1.2 Funktionale Überprüfung des Expressionsvektors PARB

Zur Überprüfung des Vektors PARB wurde einerseits das Konstrukt R36 ohne Promotorfragmente in Pflanzen transformiert und auf GUS-Expression geprüft. Dabei zeigte sich in 20 analysierten T2-Linien keinerlei Färbung in der gesamten Pflanze (ohne Abb.). Eine autonome Expression des Vektors und der rekombinierten Sequenz aus pENTR1A-ccdB wurde folglich ausgeschlossen.

Der bereits charakterisierte *GLABRA2*-Promotor (Szymanski *et al.*, 1998) wurde als positive Expressionskontrolle in PARB rekombiniert (pGL2-PARB) und auf GUS-Expression in den entsprechenden, transformierten Pflanzen untersucht.

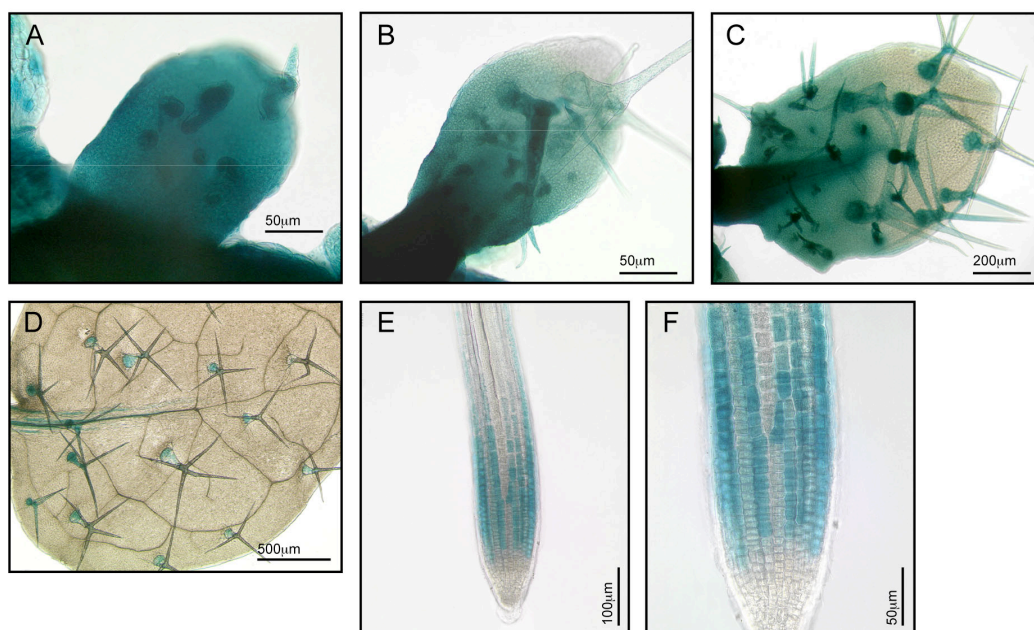


Abbildung 7: Expression des Konstrukts pGL2-PARB im Rosettenblatt und in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

GUS-Expression des Vektors pGL2-PARB in Ler Pflanzen: A-D) GUS-Expression in verschiedenen Blattstadien 18 Tage alter Pflanzen nach 24h GUS-Färbung. E-F) GUS-Expression in 3 Tage alten Wurzeln nach 2,5 Stunden Färbung.

Dabei wurde Expression in der gesamten Blattregion junger Blätter und in den sich entwickelnden Trichomen nachgewiesen. In späteren Blattstadien begrenzt sich die GUS-Aktivität auf den basalen Teil des Blattes und war in ausgewachsenen Blättern nur noch im adulten Trichom zu sehen (Abb. 7A-D). In der primären Wurzel zeigte sich auch das erwartete Zellreihen-Muster, wobei die Wurzelspitze frei blieb (Abb. 7E-F). Damit konnte das bereits beschriebene Expressionsmuster (Masucci *et al.*, 1996; Szymanski *et al.*, 1998) bestätigt werden.

2.1.3 Die Expressionstärke von *PARB*

Um zu überprüfen, ob die GUS-Expression des finalen, binären Vektors durch die Sequenz zwischen dem Ende des jeweiligen Promotorfragments und dem Beginn des 35S-Minimalpromotors verstärkt wird, wurde dieser Bereich aus Konstrukten, deren transgene Pflanzen schwache bzw. starke GUS-Expression zeigten, entfernt: Bei den Konstrukten R37, R38, R69, R71, R73, R75 und R77 handelte es sich um verschiedene *PARB*-Derivate, bei denen die Promotorfragmente vor die Gateway-Kassette kloniert wurden und die Gateway-Kassette mit dem Donor-Vektor pENTR1A-ccdB rekombiniert wurde, um die Gene der Kassette zu entfernen. Damit liegen zwischen dem Promotorfragment und dem Minimalpromotor die Gateway-Rekombinationsstellen und eine zusätzliche 65 Nukleotide umfassende Puffersequenz. Die transgenen Pflanzen mit den Konstrukten R69 (Abb. 8A), R73, R77 zeigten nach 4 Stunden eine gemäßigte GUS-Expression, die erst nach 24 Stunden GUS-Färbung vollständig in Trichomen und den Blättern sichtbar wurde (für R69 s. Abb. 8D). Die übrigen Konstrukte R37, R38, R71 (Abb. 8B) und R75 wiesen in den entsprechenden, transgenen Pflanzen bereits nach 4 h starke GUS-Expression auf.

Nach Deletion des Bereiches zwischen dem Promotorfragmenten und dem Minimalpromotor der obigen Konstrukte war GUS-Expression nur noch in den Pflanzen sichtbar, die zuvor als stark exprimierend charakterisiert wurden (R115 (Abb. 8C, F), 117, 119, 120 abgeleitet von R71, R75, R37, R38), die aber bei einem ersten, optischen Vergleich etwas schwächer erschien. Für die ehemals schwach exprimierenden Konstrukte konnte ohne diesen Bereich (R114, R116, R118 abgeleitet von R69, R73, R77) auch nach 24 Stunden GUS-Färbung in den entsprechenden transgenen Pflanzen keine Expression nachgewiesen werden (ohne Abb.)

Daraus lässt sich schließen, dass dieser Bereich mit Rekombinationsstellen und Puffersequenz zwar keine spezifische Information zur Lokalisation der Expression besitzt, aber die Expression verstärken kann. Deshalb muss beachtet werden, dass in allen verwendeten Konstrukten, denen diese Klonierungsstrategie zugrunde liegt, eine Verstärkung der Expression angenommen werden kann. Ob diese Verstärkung auch in den Konstrukten eine Rolle spielt, bei denen das jeweilige Promotorfragment zwischen den Rekombinationsstellen lokalisiert ist und damit nur die zweite

Rekombinationsstelle zwischen Promotorfragment und Minimalpromotor liegt, wurde bisher nicht untersucht.

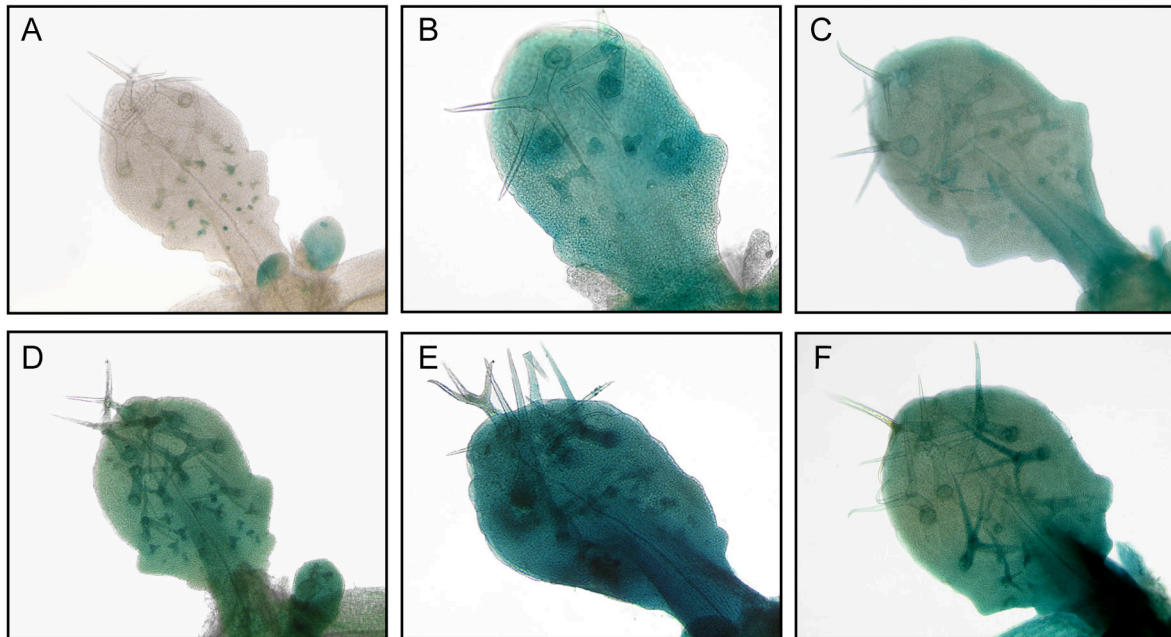


Abbildung 8: Vergleich der Expression der Konstrukte mit und ohne Gateway-Rekombinationsstellen und Puffersequenz in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Histochemische Lokalisation in Ler Pflanzen, die schwach und stark exprimierende GUS-Konstrukte mit bzw. ohne Gateway-Rekombinationsstellen und Puffersequenz tragen: Junge, sich entwickelnde Blätter des schwachen Konstruktes R69 nach 4 bzw. 24 Stunden GUS-Färbung (A, D) und des starken Konstruktes R71 nach 4 bzw. 24 Stunden GUS-Färbung (B, E). Das entsprechende Konstrukt zu R69 ohne Gateway-Bereich R114 zeigt keine GUS-Färbung nach 24 Stunden Inkubation (ohne Abb.), während das parallele Konstrukt zu R71 ohne Gateway-Bereich R115 bereits nach 4 Stunden Färbung zeigt (C), die nach 24 Stunden sehr stark ist (F).

2.2 Untersuchungen zur Variabilität transformierter Pflanzen

Die untersuchten T1- und T2-Linien der jeweils mit dem GUS-Reporter transformierten Pflanzen zeigten große Variabilität in ihrer Expressionsstärke.

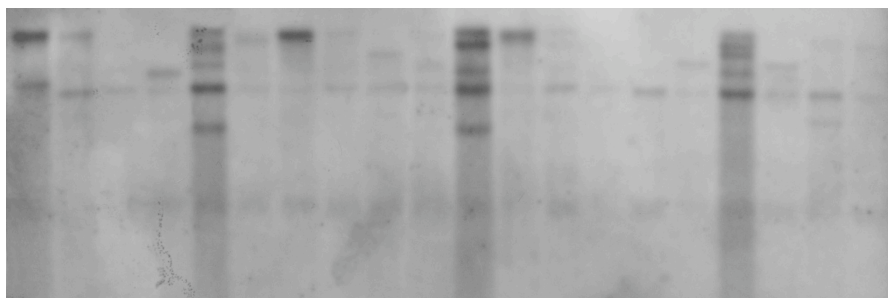


Abbildung 9: Darstellung eines Southern-Blots verschiedener Linien der Pflanzen R16

Exemplarische Darstellung eines Southern-Blots mit DIG-markierter GUS-Sonde von 20 verschiedenen T2-Linien des Konstruktes R16 in Ler-Hintergrund.

Bei der Untersuchung der Insertionszahl der T-DNAs in das jeweilige, pflanzliche Genom, zeigte sich in den verschiedenen, transgenen Linien, dass bis zu fünf Kopien festgestellt werden konnten (Abb. 9).

Um zu klären, ob diese variable Insertionsrate für den Vektor PARB und seine Derivate spezifisch ist, wurde das bereits von Larkin *et al.* (1993) beschriebene Konstrukt pGGE4, das die GUS-Expression des *GL1* 5'-Promotors und 3'-Enhancers charakterisiert, erneut in Col-Hintergrund transformiert, und die GUS-Expression analysiert. Auch hier zeigte sich eine hohe Variabilität unter den T1-Pflanzen, so dass offensichtlich die hier durchgeführte, „florale Tunkmethode“ (Floral Dip) eine hohe Variabilität der Insertionsrate bezogen auf die GUS-Expression bedingte, wie der Vergleich einer starken und einer schwachen Linie zeigte (vgl. Abb. 10A-C und Abb. 10D-F). Zwischen diesen Extremen konnten innerhalb der verschiedenen Linien alle Übergänge der Expressionsstärke identifiziert werden (ohne Abb.).

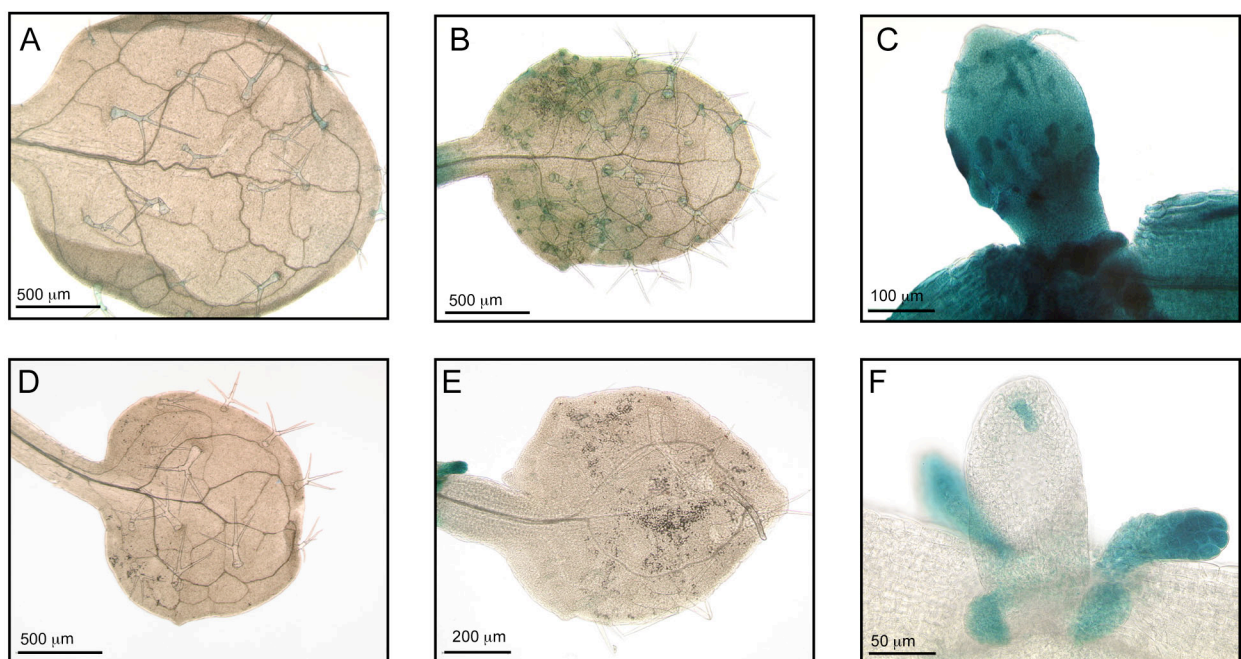


Abbildung 10: Expression des neu transformierten Konstruktes pGGE4 in Rosettenblättern von Col-Pflanzen

Histochemische GUS-Lokalisation von transgenen Col Pflanzen mit dem Konstrukt pGGE4. Vergleich verschiedener Blattstadien einer starken (A-C) und einer schwachen T1-Linie (D-F). Die Pflanzen waren 18 Tage alt und wurden 24 Stunden GUS gefärbt.

Da nicht für alle untersuchten Konstrukte eine Analyse der Insertionszahl via Southern-Blotting durchgeführt werden konnte, wurden für die Charakterisierung des jeweiligen Phänotyps für alle Konstrukte eine hohe Zahl von Linien untersucht und ihre Expressionsstärken eingestuft. In dem hier gezeigten Beispiel R5 wiesen nur die starken Linien die blattspezifische Expression in den jungen Blättern und Stipeln sowie in Trichomen im gesamten Entwicklungszeitraum der Initiation bis zum adulten Zustand auf, während für die schwachen Linien nur schwache Expression in den Trichomen und Stipeln detektiert werden konnte (vgl. Abb. 11A, B mit Abb. 11C, D). Das legt den Schluss nah, dass für die GUS-Konstrukten die stärksten Linien eine Verstärkung der schwächsten Linien darstellten. Aus diesem Grunde wurden die stärksten Linien analysiert, da sie das ganze

Expressionspotential eines Promotors widerspiegeln.

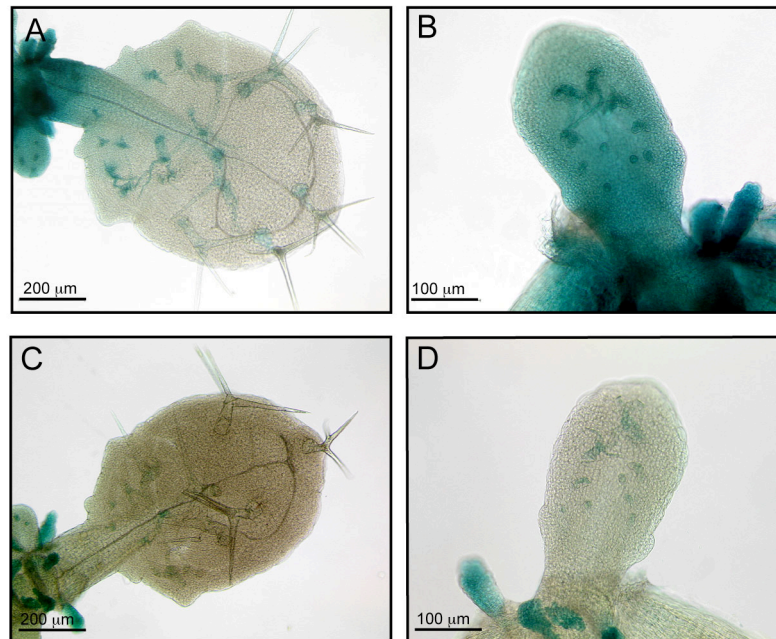


Abbildung 11: Expression verschieden starker Linien des Konstruktes R5 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Verschiedene Blattstadien einer starken (A-B) und schwachen (C-D) T2-Linie, die das Konstrukt R5 in Ler Hintergrund enthält. Die Pflanzen waren 18 Tage alt und wurden 24 Stunden GUS gefärbt.

Für die Analyse der Rettung der Funktionsverlust-Mutanten durch die jeweiligen Konstrukte ergab sich daraus allerdings das Problem, dass zur Bestimmung der Rettungseffizienz die Auswertung nicht selektiv auf wenige T2-Linien beschränkt werden konnte, die wiederum ein Gemisch aus verschiedenen hetero- und homozygoten T-DNA-Allelkombinationen sind. Aus diesem Grund wurden über 100 T1-Pflanzen (wenn möglich) analysiert, um die Verteilung der einzelnen, betrachteten Merkmale, wie Trichomanzahl, Trichomverzweigung und Trichomnestfrequenz zu ermitteln und die statistische Verteilung zu erfassen. (Die genaue Methodik kann dem Abschnitt 4.8.6 entnommen werden.)

2.3 Charakterisierung der regulatorischen Sequenzen des *GLABRA1* Gens

2.3.1 Untersuchung zur Expression des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers von *GL1*

Der 5'-Promotor (1362 bp) des *GLABRA1* Gens wurde bereits durch seine ausschließlich stipuläre Expression charakterisiert (Oppenheimer, 1991). Durch Deletionsstudien der nicht-kodierenden 3'-Sequenz konnte gezeigt werden, dass das *GLABRA1* Gen zusätzlich zu dem 5'-Promotor regulatorische 3'-Sequenzen (490 bp) erfordert, die sich hinter dem codierenden Bereich des Gens befindet und als Enhancer definiert wurde (Larkin *et al.*, 1993). Diese historische Namensgebung von 5'-Promotor und 3'-Enhancer soll in dieser Arbeit beibehalten werden.

Aufgrund der Eigenschaften eines transkriptionellen Enhancers wurde in dieser Arbeit vorausgesetzt, dass dieser definierte 3'-Bereich verstärkende Wirkung besitzt, und der 5'-Promotor das eigentliche Expressionsmuster festlegt. Aus diesem Grund sollte der 5'-Promotor weiter spezifiziert werden, wobei dies laut der obigen Veröffentlichungen nur in Kombination mit dem 3'-Enhancer möglich sein sollte. Zur Kontrolle dienten Konstrukte, in denen das GUS-Gen einerseits unter der Kontrolle des 5'-Promotors und andererseits unter der Kontrolle des 3'-Enhancers des *GLABRA1* Gens gestellt wurde (s. Abb. 12)

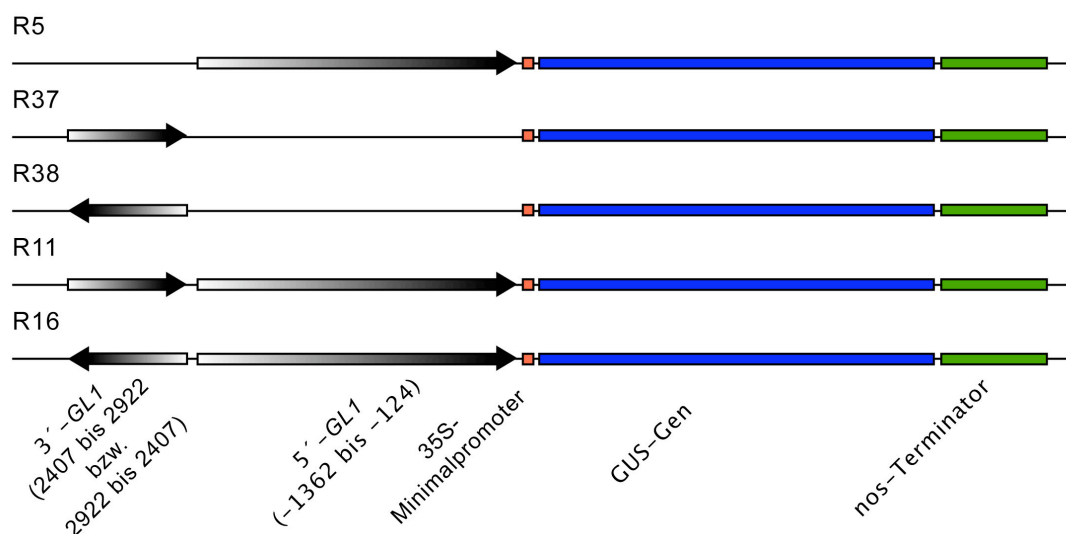


Abbildung 12: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R5, R6, R37, R38, R11 und R16

Fusionen der regulatorischen Bereiche des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers von *GL1* mit dem 35S-Minimalpromotor, dem GUS-Gen und dem nos-Terminator der Konstrukte R5, R37, R38, R11 und R16. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Da ein transkriptioneller Enhancer positions- und richtungsunabhängig sein sollte (Banerji *et al.*, 1981), wurde er in *in Vivo* Richtung oder umgekehrt vor den Minimalpromotor des Vektors PARB gebracht und die GUS-Expression analysiert (*In Vivo* Richtung: Orientierung des Fragments relativ zur cDNA wie im *Arabidopsis* Genom).

Im Gegensatz zu der publizierten, stipulären Expression vermittelte der 5'-Promotor des *GLABRA1* Gens ohne zusätzliche regulatorischen 3'-Sequenzen das für *GLI* charakteristische Expressionsmuster: Die jungen, unreifen Blätter zeigten ubiquitäre GUS-Expression und in den Trichomen von der Initiation an (Abb. 13A, B). In älteren Blättern begrenzte sich die Expression auf die Trichome (Abb. 13C, D) und war in ausgewachsen Blättern ganz verschwunden (Abb. 13E).

Auch die Kontrollen, in denen der 3'-Enhancerbereich ohne 5'-Promotor in vorwärts (R37) bzw. rückwärts (R38) Orientierung vor dem 35S-Minimalpromotor lokalisiert ist, zeigten GUS-Färbung in den entsprechenden, transgenen Pflanzen (Abb. 14). Dabei war für jede Orientierung des Enhancers die gleiche Färbung zu sehen (vgl. Abb. 14A-C mit Abb. 14D-F). Zu beachten ist allerdings, dass die ubiquitäre Blattexpression wie beschrieben in jungen Blättern begann (Abb. 14A, 14D), aber auch in alten Blättern noch zu sehen war (Abb. 14C, 14F). Auch die Expression in den Trichomen fing in den R37/ R38 Pflanzen in der Phase 1 (Szymanski, 2001; s. Einleitung) der Trichomentwicklung an und blieb bis zu den adulten Trichomen erhalten. Folglich kann man davon ausgehen, dass die Expression im Gegensatz zu dem ursprünglichen *GLI*-Promotor (pGGE4) und zum isolierten 5'-Promotor (R5) zeitlich verlängert wurde. Da der Enhancer in den GUS-Konstrukten R37 und R38 vor die Gateway-Rekombinationsstellen fusioniert wurde, zeigte ein Kontrollkonstrukt, dass er auch zwischen den Rekombinationsstellen dieselbe Expression lieferte (ohne Abb.).

Betrachtet man die GUS-Expression in den transgenen Pflanzen R11 und R16, die sowohl den 5'-Promotor als auch den 3'-Enhancer in 5'-Position enthielten (Abb. 15), so stellt man fest, dass die Lokalisation kaum unterscheidbar von der Expression war, die durch den 3'-Enhancer alleine gesteuert wurde (vgl. mit R37 und R38 in Abb. 14). Einziger Unterschied stellte die Expression in den alten Blättern dar, in denen die basale Expression nur noch schwach zu erkennen bzw. nur noch im Bereich der Petiolen oder Mittelrippe gut zu sehen war (vgl. Abb. 15C und Abb. 14C). Auch hier war die Orientierung des Enhancers unbedeutend, da das Konstrukt mit 5'-Promotor und dem Enhancer in *in Vivo*-Richtung (R11) in Pflanze keine Unterschiede zu dem Konstrukt mit Enhancer in umgekehrter Richtung (R16) aufwies.

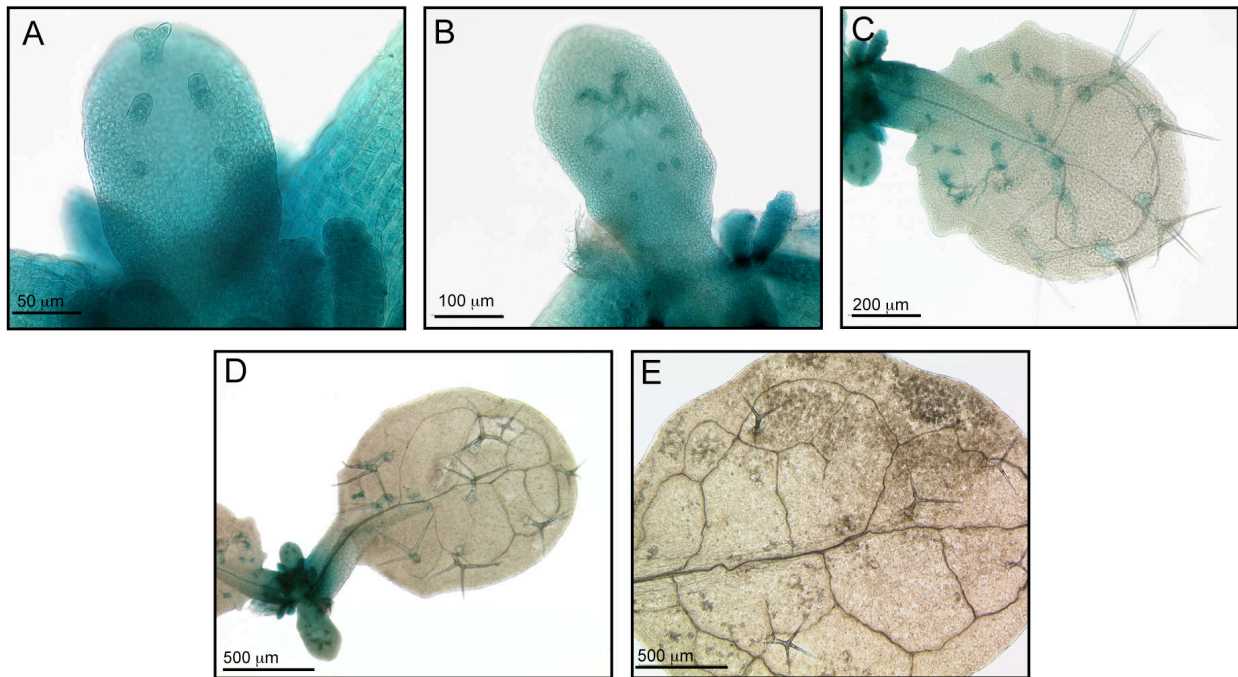


Abbildung 13: Expression des Konstruktes R5 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Histochemische Lokalisierung des 5'-Promotors des *GLABRA1* Gens mit dem Konstrukt R5 in *Ler* Hintergrund nach 24 h GUS-Färbung. In A-E) sind verschiedene Rosettenblätter mit zunehmenden Alter dargestellt.

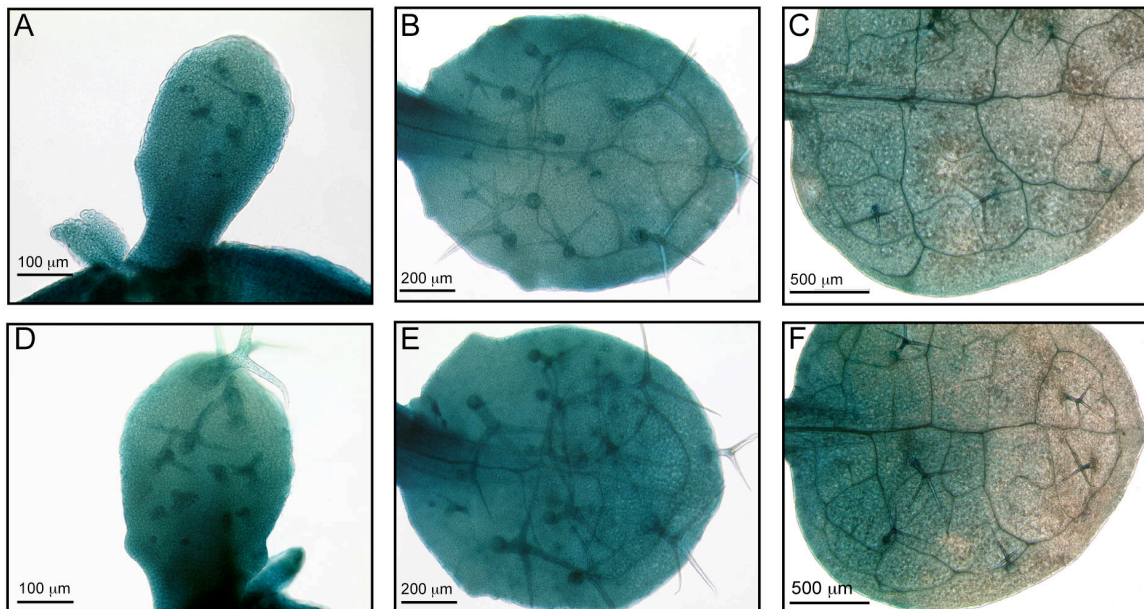


Abbildung 14: Expression der Konstrukte R37, R38 und R6 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression des 3'-Enhancers des *GLABRA1* Gens in 5'-Position mit dem Konstrukt R37 in *in Vivo*- (A-C) und umgekehrter Richtung R38 (D-F) in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien dargestellt.

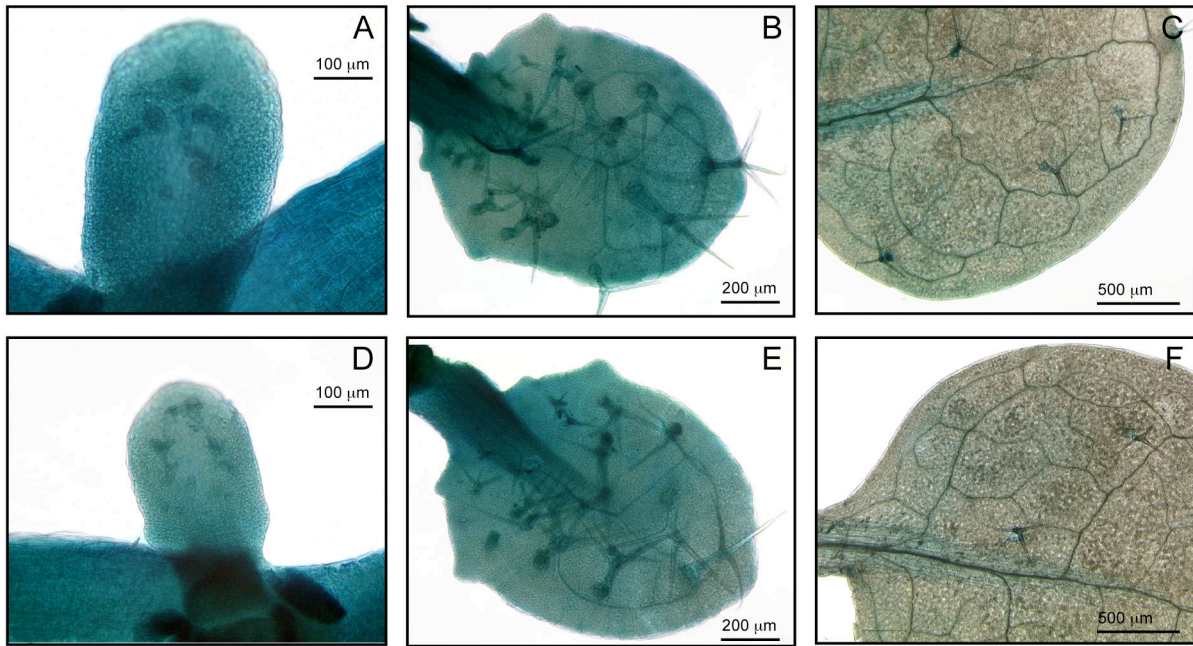


Abbildung 15: Expression der Konstrukte R11 und R16 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression des 3'-Enhancers in 5'-Position in Kombination mit dem 5'-Promotor des *GLABRA1* Gens mit dem Konstrukt R11 in *in Vivo*- (A-C) und umgekehrter Richtung R16 (D-F) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien dargestellt.

Um die Qualität der Expression des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers für die Musterbildung zu verstehen, wurden transgene Pflanzen in der *gl1(39F12)* Funktionsverlust-Mutante, die keine Trichome auf den ersten Rosettenblättern tragen (Tab. 1), erzeugt. Die cDNA von *GLABRA1* wurde unter die Kontrolle des isolierten 3'-Enhancers in *in Vivo*-Richtung mit dem 5'-Promotor (R64) bzw. unter jeweils den Einfluss des 3'-Enhancers (R65) oder des 5'-Promotors (R66) gestellt (Abb. 16).

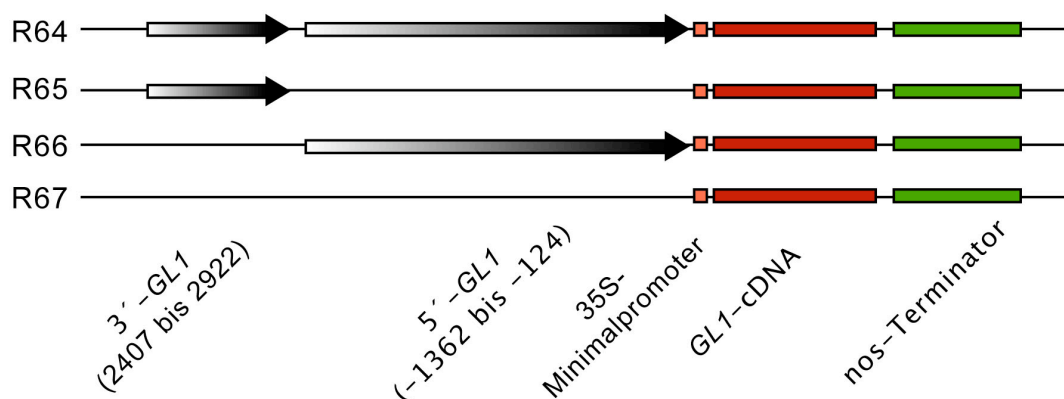


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R64, R65 und R66

Schematische Darstellung der Fusionen der regulatorischen Bereiche 5'-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* mit dem 35S-Minimalpromotor, der *GL1*-cDNA und dem nos-Terminator der Konstrukte R64, R65 und R66 zur Rettungsanalyse. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Bei der Untersuchung der Rettungseffizienz (Abb.17) des 3'-Enhancer mit dem 5'-Promotor (R64) konnte über eine Vielzahl von T1-Pflanzen hohe Trichomzahlen auf den ersten vier Rosettenblättern festgestellt werden, die aber nicht die Trichomdichte des Wildtyps erreichten. Lagen die höchsten Trichomzahlen im Wildtyp *Ler* bei 12, 13, 29 bzw. 40 für die ersten vier Rosettenblätter, so fanden sich bei R64 9, 11, 24 bzw. 31 Trichome auf den entsprechenden Blättern (Tab. 1). Das Konstrukt R65, das nur den 3'-Enhancer als regulatorischen Bereich trägt, zeigte tendenziell eine schwächere Rettungseffizienz als R64. Hier befanden sich maximal 6, 8, 15 bzw. 20 Trichome auf jeweils Blatt 1, 2, 3 oder 4, und die Anzahl der Trichome innerhalb der Gesamtheit der T1-Pflanzen war im Vergleich zu R64 deutlich niedriger. Der hier gewählte 5'-Promotor (-1362 bis -124) alleine konnte den *gll* Hintergrund nicht retten (R66), wie die vollständig nackten Rosettenblätter 1-4 zeigten (Tab. 1). Ebenso war das Kontrollkonstrukt R67 ohne regulatorische Sequenzen nicht in der Lage, die Mutante zu retten.

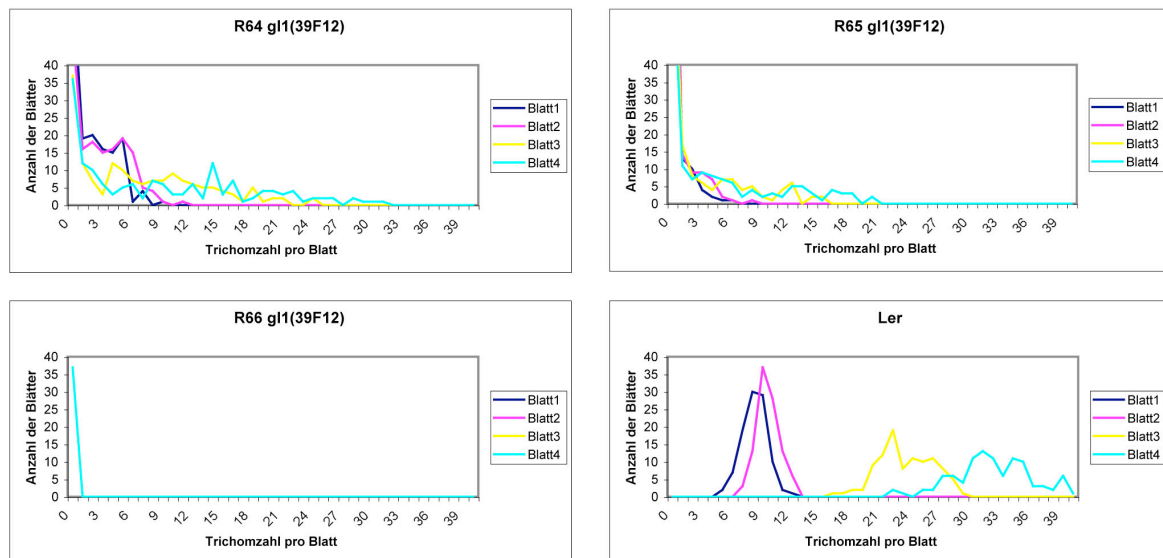


Abbildung 17: Rettungseffizienz der transgenen *gll* Pflanzen mit den Konstrukten R64, R65, R66 und der Kontrolle *Ler*

Darstellung der Rettungseffizienz des 5'-Promotors in Kombination mit dem 3'-Enhancer von *GL1* in 5'-Position in *in Vivo*-Richtung (R64), des 3'-Enhancers von *GL1* (R65) und des 5'-Promotors von *GL1* in *gll(39F12)* Hintergrund. Zur Kontrolle wurden *Ler* Pflanzen hinzugezogen. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1,2,3,oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation (R64- 66 n = 160; *Ler* n = 100).

Tabelle 1: Maximale Trichomzahlen der transgenen *gll* Pflanzen mit den Konstrukten R64, R65, R66 und der Kontrolle *Ler* auf den ersten vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
<i>Ler</i>	12	13	29	40
<i>gll(39F12)</i>	0	0	0	0
R64 <i>gll(39F12)</i>	9	11	24	31
R65 <i>gll(39F12)</i>	6	8	15	20
R66 <i>gll(39F12)</i>	0	0	0	0
R67 <i>gll(39F12)</i>	0	0	0	0

2.3.2 Transkriptionsmuster und Rettungseffizienz des 3'-GL1-Enhancers in 3'-Position zum kodierenden Bereich des GL1-Gens

Um zu überprüfen, ob die Lokalisierung des 3'-Enhancers vor dem 35S-Minimalpromotor die Ursache für die autarke Rolle des Enhancers in der Regulation der Transkription darstellt, wurde der 3'-Enhancer in den Konstrukten R36 und R5 (hier ist kein Promotor bzw. der 5'-Promotor von GL1 vor dem 35S-Minimalpromotor) hinter den kodierenden Bereich des GUS-Gens und dem folgenden nos-Terminator in *in Vivo* und umgekehrter Orientierung positioniert (Abb. 18). Damit wurde zum einen die GUS-Expression nur durch den 35S-Minimalpromotor und 3'-Enhancer (R36-3'-GL1-for/-rev), und zum anderen über den 5'-Promotor vor dem 35S-Minimalpromotor und den 3'-Enhancer (R5-3'-GL1-for/-rev) reguliert.

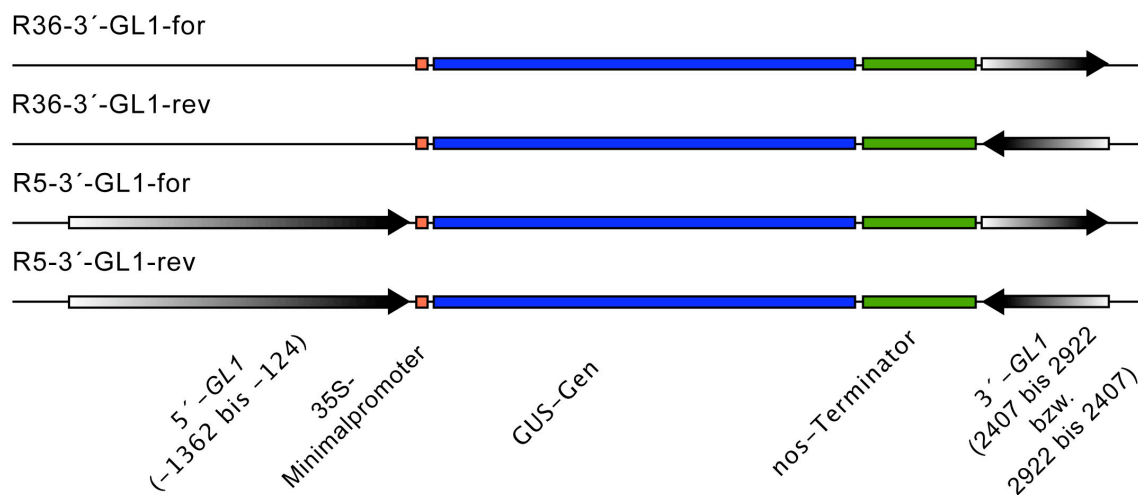


Abbildung 18: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R36-3'-GL1-for, R36-3'-GL1-rev, R5-3'-GL1-for und R5-3'-GL1-rev

Fusionen der regulatorischen Bereiche 5'-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* mit dem 35S-Minimalpromotor, dem GUS-Gen und dem nos-Terminator der Konstrukte R36-3'-GL1-for, R36-3'-GL1-rev, R5-3'-GL1-for und R5-3'-GL1-rev. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Bei der Analyse der entsprechenden transgenen Pflanzen zeigte sich, dass der 3'-Enhancer auch in 3'-Position in der Lage war, eine starke GUS-Expression in den Rosettenblättern zu vermitteln. Die GUS-Expression war in jungen Blättern (Abb. 19A) sehr stark und blieb bis zum adulten Blatt erhalten (Abb. 19B). Dies entsprach der Lokalisation, die der 3'-Enhancer auch in 5'-Position lieferte (R37, R38; vgl. Abb. 14). Dieselbe GUS-Expression im jungen Blatt konnte auch beobachtet werden, wenn zusätzlich der 5'-Promotor (Pr9) vor den 35S-Minimalpromotor fusioniert wurde (R5-3'-GL1-for/-rev, Abb. 19C). Die Expression im adulten Blatt und in dessen Trichomen war aber stärker als in den Konstrukten, die nur den 3'-Enhancer tragen (vgl. Abb. 19B und 19D). Eine Verstärkung im adulten Blatt war auch gegenüber den Konstrukten R11 und R16 festzustellen, die den 3'-Enhancer und den 5'-Promotor in 5'-Position tragen (Abb. 15B, D).

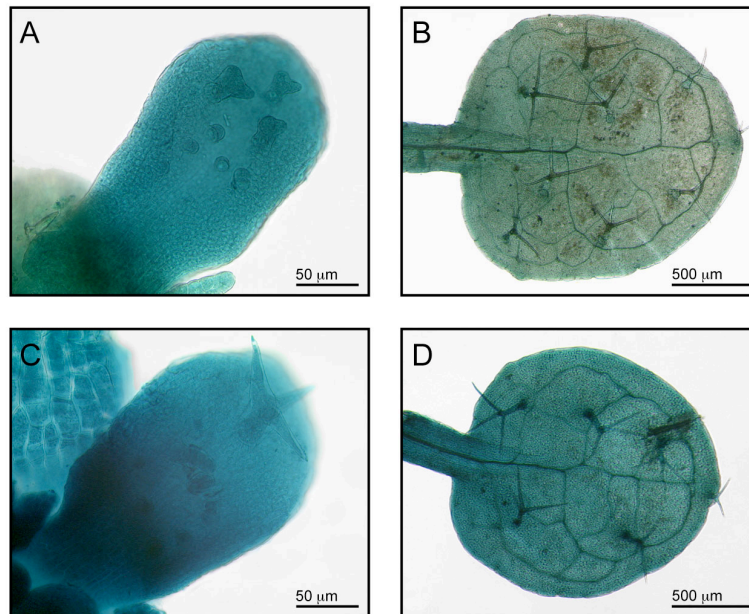


Abbildung 19: Expression der Konstrukte R36-3'-GL1-rev und R5-3'-GL1-rev in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression, die durch den 3'-Enhancer in 3'-Position (R36-3'-GL1-rev, A, B) und durch den 3'-Enhancers in 3'-Position in Kombination mit dem 5'-Promotor (R5-3'-GL1-rev, C, D) des *GLABRA1* Gens in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung vermittelt wird. Es sind jeweils zwei verschiedene Blattstadien dargestellt.

Um die regulatorischen Eigenschaften des 3'-Enhancers in der 3'-Position zu charakterisieren, wurde das GUS-Gen durch die *GL1*-cDNA ersetzt (Abb. 20) und in die *gll(39F12)* Funktionsverlust-Mutante transformiert.

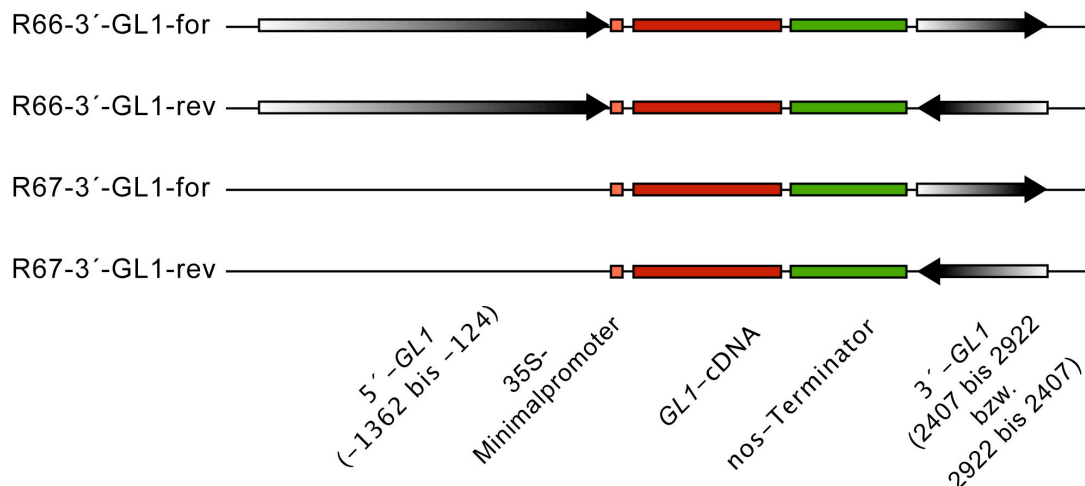


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev

Fusionen der regulatorischen Bereiche 5'-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* mit dem 35S-Minimalpromotor, der *GL1*-cDNA und dem nos-Terminator der Konstrukte R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev zur Rettungsanalyse. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

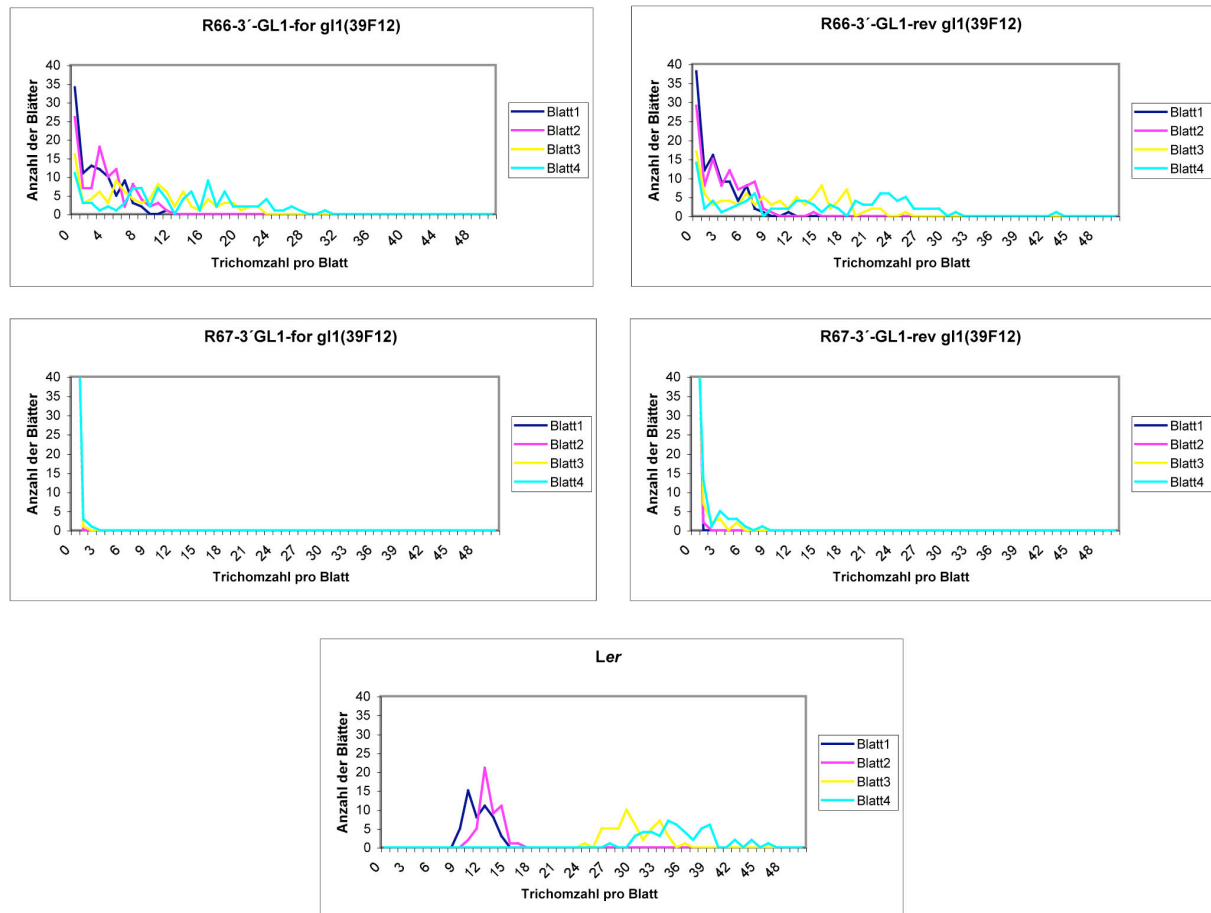


Abbildung 21: Rettungseffizienz der transgenen *g/1* Pflanzen mit den Konstrukten R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev und der Kontrolle *Ler*

Darstellung der Rettungseffizienz des 5'-Promotors in Kombination mit dem 3'-Enhancer von *GL1* in 3'-Position in *in Vivo*-Richtung (R66-3'-GL1-for) und umgekehrter Richtung (R66-3'-GL1-rev) und des 3'-Enhancers von *GL1* alleine in *in Vivo*-Orientierung (R67-3'-GL1-for) und umgekehrter Richtung (R67-3'-GL1-rev) in *g/1(39F12)* Hintergrund. Zur Kontrolle wurden *Ler* Pflanzen hinzugezogen. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1,2,3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation ($n = 100$).

Tabelle 2: Maximale Trichomzahlen der transgenen *g/1* Pflanzen mit den Konstrukten R66-3'-GL1-for, R66-3'-GL1-rev, R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev und der Kontrolle *Ler* auf den ersten vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
R66-3'-GL1-for <i>g/1(39F12)</i>	11	11	22	30
R66-3'-GL1-rev <i>g/1(39F12)</i>	11	14	25	43
R67-3'-GL1-for <i>g/1(39F12)</i>	0	0	1	3
R67-3'-GL1-rev <i>g/1(39F12)</i>	0	1	5	8
<i>Ler</i>	14	16	36	45

Dabei zeigte sich, dass der 3'-Enhancer in 3'-Position als einzige, regulatorische Sequenz (R67-3'-GL1-for und R67-3'-GL1-rev) kaum eine Tendenz zur Rettung aufwies (Abb. 21, Tab. 2). In sehr wenigen Linien konnten Trichome auf den ersten vier Rosettenblättern festgestellt werden, die in sehr niedriger Zahl vorhanden waren. Die Rettungseffizienz war für die *in Vivo*-Orientierung

schlechter als für die umgekehrte Richtung des Enhancers. Die Rettungseffizienz lag eindeutig unter der des 3'-Enhancers in 5'-Position mit dem Konstrukt R65 (vgl. Abb. 17 und Tab. 1).

Die Kombination der regulatorischen Bereiche von 5'-Promotor in 5'-Position und 3'-Enhancer in 3'-Position (R66-3'-GL1-for und R66-3'-GL1-rev) lieferte dagegen sehr gute Rettungseffizienzen über die Gesamtheit der T1-Pflanzen (Abb. 21). Dabei war die Richtung des Enhancers nicht entscheidend, da beide Konstrukte eine vergleichbare Rettungseffizienz aufwiesen. Mit maximalen Trichomzahlen von 11, 14, 25 und 43 Trichomen auf den Rosettenblättern 1-4 wurde fast die Trichomanzahl von 14, 16, 36 und 45 des entsprechenden Wildtyps *Ler* erreicht (s. Tab. 2). Die Effizienz für die Rettung war mit der Kombination 5'-Promotor und 3'-Enhancer in 3'-Position tendenziell besser, als wenn die Positionierung des Enhancers und der Promotors in 5'-Position erfolgte (vgl. R64 in Abb. 17 und Tab. 1).

2.3.3 Kombination des 3'-Enhancers von *GL1* mit dem 35S-Promotor

Zur weiteren Charakterisierung des 3'-Enhancers von *GL1* sollte seine Fähigkeit untersucht werden mit dem CaMV-35S-Gesamtpromotor auf cis-regulatorischer Ebene zu interagieren. Dazu wurde der 3'-Enhancer im Konstrukt 35S::GUS-pAMPAT hinter das GUS-Gen und vor den 35S-Terminator kloniert. Der Enhancer wurde in beiden Richtungen zu den Konstrukten 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev eingebaut (Abb. 22).

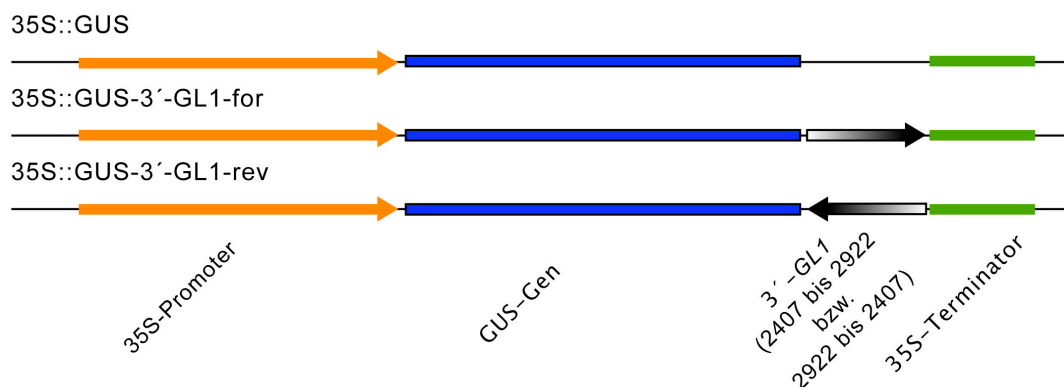


Abbildung 22: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte 35S::GUS, 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev

Fusionen der regulatorischen Bereiche CaMV-35S-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* mit dem GUS-Gen der Konstrukte 35S::GUS, 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

In den 35S::GUS Pflanzen fand man eine ubiquitäre GUS-Expression in allen Pflanzenorganen. Exemplarisch ist hier die Expression in den Kotyledonen gezeigt (Abb. 23G). Die Rosettenblätter zeichneten sich durch ein fleckenartiges Expressionsmuster aus (Abb. 23B, C). Dabei konnte in den Trichomen nur teilweise GUS-Expression detektiert werden. Das Fehlen der GUS-Färbung in jungen Blättern war in vielen Linien auffällig (Abb. 23A).

Im Gegensatz dazu besaßen viele Linien der Pflanzen 35S::GUS-3'-GL1 ein anderes Expressionsmuster, welches das typische *GL1*-Muster widerspiegelte, das durch den 3'-Enhancer vermittelt wurde (starke GUS-Färbung in den Rosettenblättern vom jüngsten bis zu alten Blättern; vgl. Abb. 23D-F und 23A-B). GUS-Expression in den Trichomen fand man kontinuierlich über den ganzen Entwicklungszeitraum. Die ubiquitäre 35S-Expression in anderen Pflanzenorganen war nicht mehr vorzufinden, wie hier anhand der Kotyledonen gezeigt werden kann (vgl. Abb. 23G und H). Die Orientierung des Enhancers war dabei unerheblich. Es sei aber darauf hingewiesen, dass in einigen transformierten Pflanzenlinien der Konstrukte 35S::GUS-3'-GL1-for/-rev das fleckenartige Muster, das für das 35S::GUS Konstrukt oben beschrieben wurde, auch zu finden war.

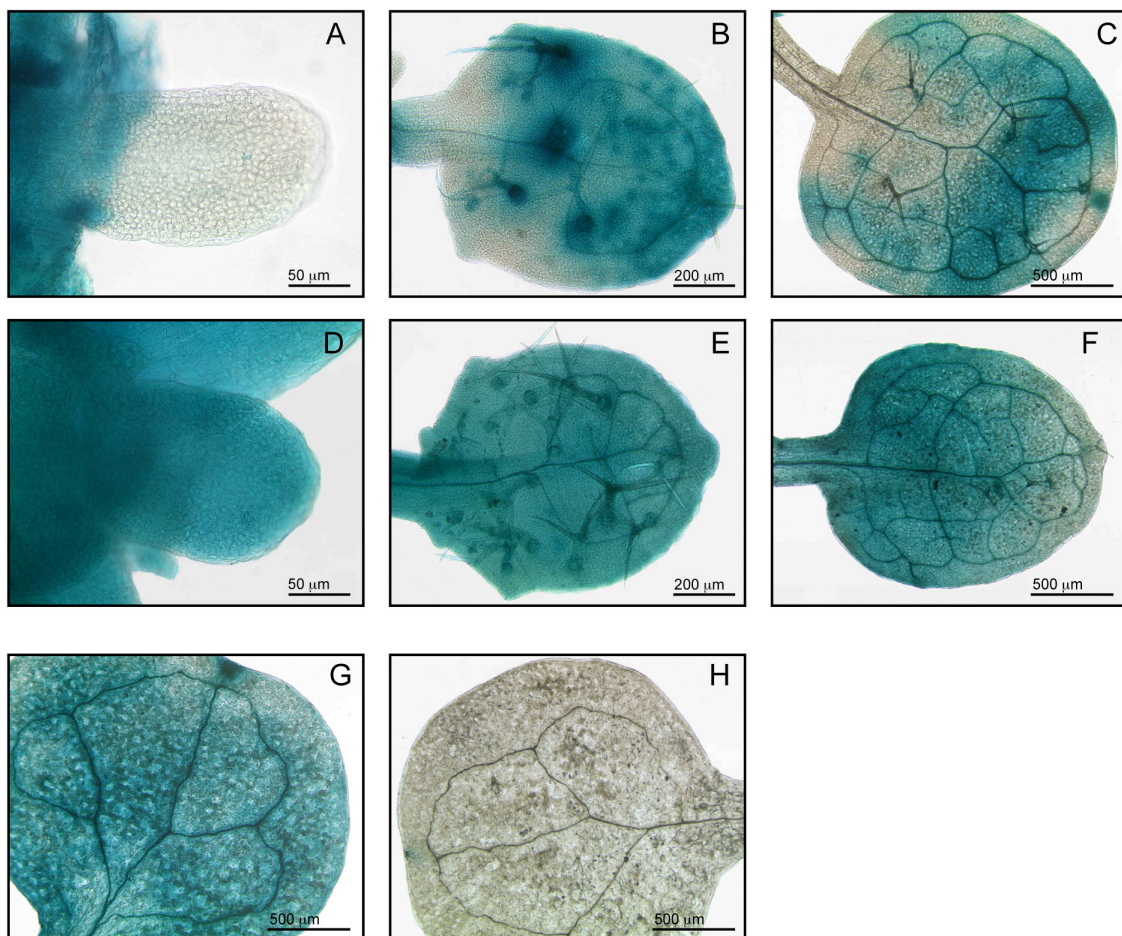


Abbildung 23: Expression der Konstrukte 35S::GUS, 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der 35S::GUS-Expression (A-C, G) und der 35S::GUS-3'-GL1-Expression (D-F, H) in drei verschiedenen alten Blattstadien (A-F) und in den Kotyledonen (G, H) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung.

Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit des 3'-Enhancers zur Veränderung der 35S-Expression auch einen Einfluss auf die Musterbildung besitzt, wurde das GUS-Gen gegen die *GL1*-cDNA ausgetauscht (Abb. 24) und die entsprechenden Konstrukte in die *gll(39F12)* Funktionsverlust-Mutante transformiert.

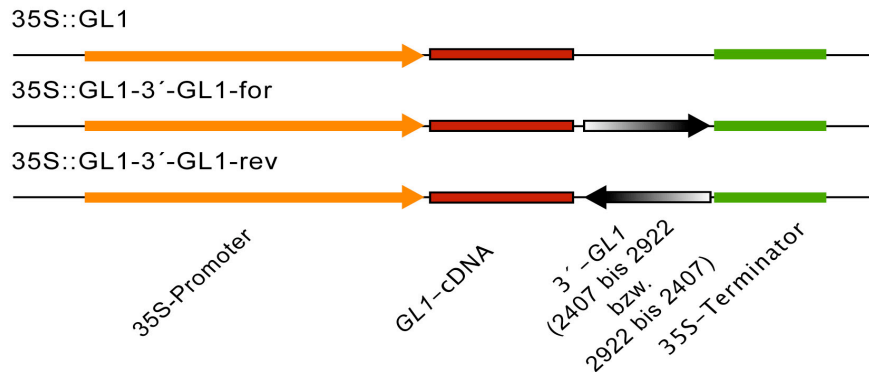


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev

Fusionen der regulatorischen Bereiche CaMV-35S-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* mit dem *GL1*-cDNA der Konstrukte R35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev zur Rettungsanalyse. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Die 35S::GL1 *gll* Pflanzen zeigten eine gemäßigte Rettung des *gll*-Phänotypes, da nur wenige T1-Pflanzen eine höhere Trichomzahl auf den ersten vier Rosettenblättern aufwiesen (Abb. 25), viele Linien waren ungerettet. Trotzdem betrug die maximale Trichomzahl 5, 6, 20 und 34 auf Blatt 1-4 (Tab. 3). Die Orientierung des Enhancers in den 35S::GL1-3'-GL1 *gll* Pflanzen spielte eine große Rolle für die Rettungseffizienz. Die *in Vivo* Richtung führte zu einer schwächeren Rettung als die des 35S::GL1-Konstrukts (Abb. 25). Die maximalen Trichomzahlen betrugen jeweils nur noch 1, 2, 11 und 11 Trichome auf den ersten vier Blättern. Hingegen lieferten die Pflanzen 35S::GL1-3'-GL1-rev *gll* sehr gute Rettungseffizienzen. Nur noch eine geringe Anzahl der T1-Pflanzen war nackt. Ein großer Anteil der T1-Pflanzen wies hohe Trichomzahlen auf. Deutlich mehr T1-Pflanzen zeigten eine gute Rettung der ersten vier Blätter als mit der Kombination 5'-Promotor und 3'-Enhancer von *GLABRA1*. Die maximalen Trichomzahlen betrugen 9, 12, 28 und 40 auf den ersten vier Rosettenblättern und entsprachen damit den Werten des zu vergleichenden Wildtyps *Ler*.

Damit konnte gezeigt werden, dass der 3'-Enhancer (in der zur *in Vivo*-Richtung umgekehrten Orientierung) die Fähigkeit des 35S-Promotors zur Musterbildung drastisch erhöhen kann.

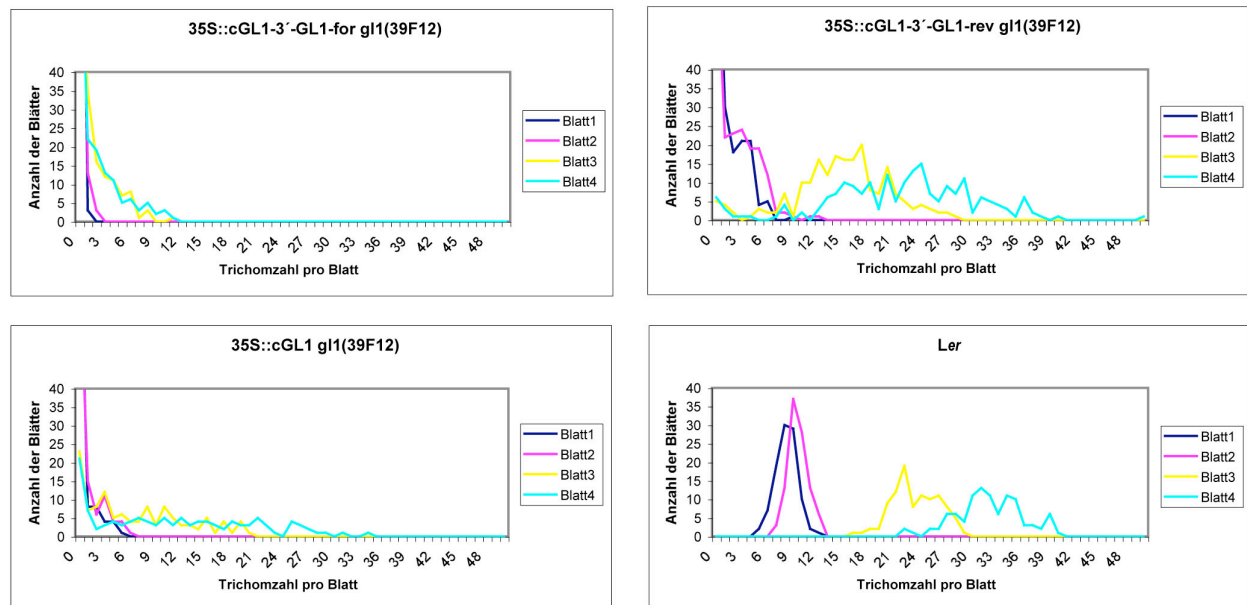


Abbildung 25: Rettungseffizienz der transgenen *gl1* Pflanzen mit den Konstrukten 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev und der Kontrolle *Ler*

Darstellung der Rettungseffizienz der *GL1*-cDNA unter der Regulation des 35S-Promotors alleine (35S::GL1) in Kombination mit dem 3'-Enhancer von *GL1* in 3'-Position in *in Vivo*-Richtung (35S::GL1-3'-GL1-for) und in umgekehrter Richtung (35S::GL1-3'-GL1-rev) in *gl1(39F12)* Hintergrund. Zur Kontrolle wurden *Ler* Pflanzen hinzugezogen. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1,2,3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation ($n = 100$).

Tabelle 3: Maximale Trichomzahlen der transgenen *gl1* Pflanzen mit den Konstrukten 35S::GL1, 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev und der Kontrolle *Ler* auf den ersten vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
35S::cGL1 <i>gl1(39F12)</i>	5	6	20	34
35S::cGL1-3'-GL1-for <i>gl1(39F12)</i>	1	2	11	11
35S::cGL1-3'-GL1-rev <i>gl1(39F12)</i>	9	12	28	40
<i>Ler</i>	12	12	29	40

2.3.4 Vergleichende Untersuchung des 5'-Promotors von *GL1* in *Ler* und *Col* Hintergrund

Im Gegensatz zu der veröffentlichten Expression des 5'-Promotors von *GLABRA1* (Oppenheimer, 1991) war die GUS-Lokalisation nicht nur auf die Stipeln beschränkt. Daher wurden die möglichen Ursachen dieses Unterschiedes überprüft: 1) Zwischen den beiden jeweils verwendeten *Arabidopsis*-Ökotypen *Col* und *Ler* könnten verschiedene Expressionsmuster ausgebildet werden. 2) Ökotypen-Unterschiede der verwendeten DNA könnten verantwortlich sein. 3) Kurze distale und proximale Sequenzverlängerungen könnten bei dem Konstrukt von Oppenheimer *et al.* (1991) eine inhibitorische Wirkung besitzen.

Die verwendete Sequenz des 5'-Promotors (Pr9 in R5) umfasste den Bereich von -1362 bis -124 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*. Zur Amplifikation der genomischen Sequenz diente *Ler*-DNA. Das bereits beschriebene Konstrukt *GL1p/GUS* (Oppenheimer *et al.*,

1991) trug den Bereich von –1380 bis –19 aus Col.

Es wurden folgende Konstrukte erstellt (s. Abb. 26), um herauszufinden, ob unterschiedlich lange Promotorsequenzen verantwortlich für die Expressionsunterschiede sein könnten: 5'-GL1-Promotor mit *Ler*-DNA von –1362 bis –17 (Pr9a in R90), von –1411 bis –124 (Pr78 in R161) und von –1411 bis –17 (Pr79 in R162). Außerdem wurde der Bereich von –1411 bis –17 aus Col (Pr79-Col in R222) genutzt, um die Frage nach der unterschiedlichen Ökotypen-DNA zu klären. Jedes der GUS-Konstrukte (R5, R90, R161, R162, R222) wurde in *Ler* und Col Hintergrund transformiert, damit die Einflüsse des Ökotypen-Hintergrundes überprüft werden konnten.

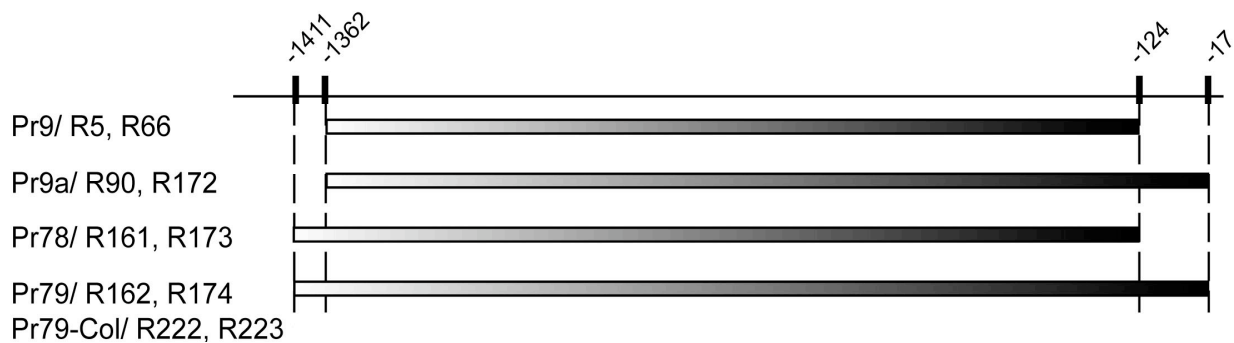


Abbildung 26: Unterschiedliche 5'-Promotor-Gesamtfragmente des GL1-Gens

Schematische Darstellung der unterschiedlichen 5'-Promotorvariationen des *GLABRA1* Gens in den Entry-Vektoren Pr9, 9a, 78, 79, die in den Konstrukten R5, R90, R161, R162 und R222 zur GUS-Expression und in den Konstrukten R66, R172, R173, R174 und R223 zur Rettung mit GL1 cDNA genutzt wurden. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

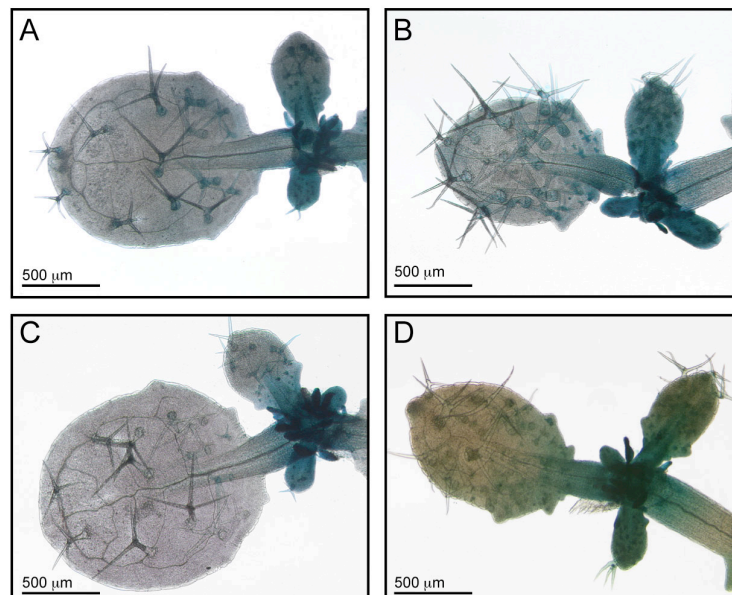


Abbildung 27: Expression der Konstrukte R162 und R222 in Rosettenblättern von Ler- und Col Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression nach 24 Stunden Färbung des 5'-Promotors von *GLABRA1* entsprechend der Sequenz von Oppenheimer (1991) mit den Konstrukten R162 (A, B) mit *Ler* DNA und R222 (C, D) mit *Col* DNA. Beide Konstrukte wurden in *Ler* (A, C) und *Col* Hintergrund (B, D) transformiert.

Bei der GUS-Analyse ließen sich kaum Unterschiede feststellen. Alle Konstrukte zeigten in beiden

Wildtyp-Hintergründen die für R5 bereits beschriebene GUS-Expression (exemplarische Darstellung für R162 und R222 in Abb. 27). Junge Blätter waren vollständig gefärbt, und die Expression wurde bei zunehmender Adoleszenz des Blattes auf den basalen Teil des Blattes und die Trichome beschränkt. Mit weiterer Entwicklung des Blattes war die Expression nur noch in den Trichomen und letztendlich im adulten Blatt nicht mehr nachzuweisen. Mit dem 5'-Promotor der Col Sequenz (R222) wurde allerdings etwas schwächer exprimiert (Vgl. Abb. 27 A, B mit Abb. 27C, D).

Im Gegensatz zur GUS-Analyse konnten deutliche Unterschiede in der Rettungseffizienz des *gl1(39F12)*- Allels der verschiedenen 5'-Promotor-Sequenzen mit *GLI* cDNA festgestellt werden (Abb. 28, Tab. 4). Konnten die Konstrukte mit *Ler* DNA R66 (-1362 bis -124 in Pr9) (s. Abb.17, Tab. 1) und R173 (-1411 bis -124 in Pr78) keine Trichome in *gl1* Hintergrund initiieren, so besaßen R172 (-1362 bis -17 in Pr9a) und R174 (-1411 bis -17 in Pr79) die Fähigkeit zu einer geringen Rettung, wie die Trichomverteilung und die maximale Trichomzahl von 4, 6, 13, 15 bzw. 3, 5, 11 und 11 auf Rosettenblatt 1 bis 4 zeigte. Auch das Konstrukt R223 mit der vergleichbaren Col-Sequenz zu R174 (-1411 bis -17 in Pr79-Col) wies eine geringe Tendenz zur Rettung auf, war aber schwächer als das entsprechende Konstrukt R174. Hier war die Trichomverteilung zu geringeren Werten von nur jeweils 1, 3, 4 und 10 Trichomen auf Blatt 1 bis 4 verschoben.

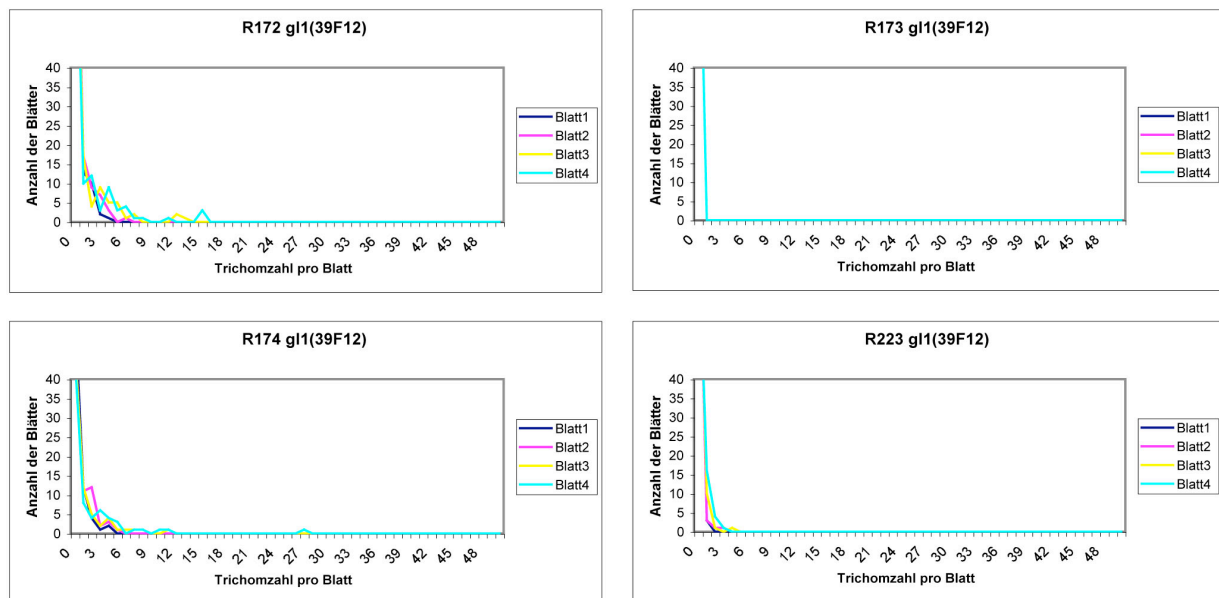


Abbildung 28: Rettungseffizienz der transgenen *gl1* Pflanzen mit den Konstrukten R172, R173, R174 und R222

Darstellung der Rettungseffizienz des 5'-Promotors von *GLABRA1* in *gl1(39F12)* Hintergrund: Das Konstrukt R172 trägt die Promotorsequenz mit *Ler* DNA von -1362 bis -17, R173 von -1411 bis -124 und R174 von -1411 bis -17. R223 entspricht der Sequenz von R174 mit Col DNA. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1,2,3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation (R64- 66 n = 100).

Tabelle 4: Maximale Trichomzahlen der transgenen *gI1* Pflanzen mit den Konstrukten R172, R173, R174 und R222 auf den ersten vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
Ler	12	13	29	40
R66 <i>gI1(39F12)</i>	0	0	0	0
R172 <i>gI1(39F12)</i>	4	6	13	15
R173 <i>gI1(39F12)</i>	0	0	0	0
R174 <i>gI1(39F12)</i>	3	5	11	11
R223 <i>gI1(39F12)</i>	1	3	4	10

Daraus lässt sich schließen, dass der proximale Sequenzbereich von -123 bis -17 eine verstärkende Wirkung auf den 5'-Promotor von -1362 bis -124 ausübte (s. Abb. 29). Außerdem war eine geringfügige Verstärkung der Expression mit *Ler* DNA gegenüber der *Col* DNA zu erkennen.

Die Ursache für den Unterschied zwischen der publizierten Expression des Konstruktes GL1p/GUS von Oppenheimer *et al.* (1991) und dem hier untersuchten Konstrukten auf der Basis des Vektors PARB ist folglich nicht auf Ökotypenunterschiede zwischen *Col* und *Ler* oder der Varianz zwischen den gewählten Sequenzbereichen zurückzuführen.

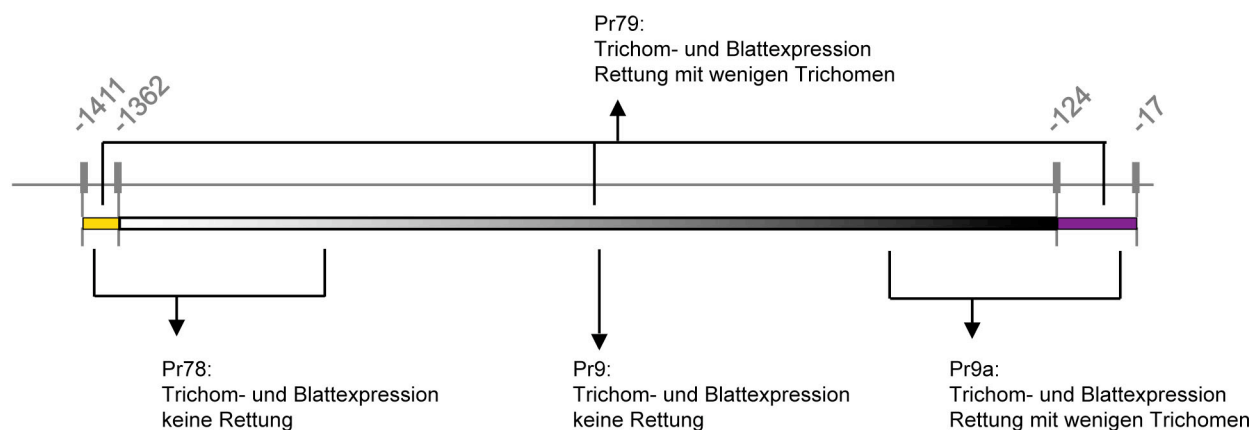


Abbildung 29 Überblick der Ergebnisse der GUS- und Rettungsanalyse des 5'-Promotors von *GL1* und der zusätzlichen proximalen bzw. distalen Sequenzverlängerungen

Dargestellt sind die Ergebnisse, die sich aus der Kombination des 5'-Promotors Pr9 mit den proximalen und distalen kurzen Sequenzen (lila und gelb) ergaben, die entsprechend dem Oppenheimer *et al.* (1991) Konstrukt zusätzlich fusioniert wurden. Die Positionen beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GL1*.

2.3.5 Identifikation des Transkriptionsstartes von *GL1*

Da der Sequenzbereich des 5'-Promotors von *GLABRA1* von -125 bis -19 eine verstärkende Wirkung für die Expression besaß, wurde durch 5'-RACE-Technik der Transkriptionsstart von *GLABRA1* bestimmt. Dabei ergaben sich 3 verschiedene Startstellen bei -85, -74 und -45 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*. Das längste Amplifikat mit -85 soll hier als die eigentliche Transkriptionsstartstelle betrachtet werden, da ein verfrühter Abbruch der reversen Transkription oft zu einer Heterogenität der RACE-Produkte führt (Flouriot *et al.*, 1999). Da des

Weiteren die mutmaßliche, proximal zum endogenen Translationsstart gelegene TATA-Box durch PLACE-Datenbankanalyse bei –118 bp identifiziert werden konnte (s. Abb. 41), scheint ein 33bp nachfolgender Transkriptionsstart sehr wahrscheinlich, denn die TATA-Box sollte sich ca. 30 bp hinter dem Transkriptionsstart befinden (Kollmar und Farnham, 1993).

2.3.6 Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche des 5'-Promotors von *GL1*

Da der 5'-Promotor von *GLABRA1* unabhängig von anderen Sequenzbereichen GUS-Expression in den Trichomen und ubiquitär in Blättern zeigte, sollte der dafür verantwortliche Sequenzbereich stärker eingegrenzt werden. Dazu wurde der Promotor in 3 überlappende Fragmente von –1362 bis –884 (Pr1), von –923 bis –394 (Pr3) und von –520 bis –124 (Pr5) untergliedert. Außerdem wurde das vorderste Fragment auf –380 bis –124 (Pr7) weiter eingegrenzt (s. Abb. 30).

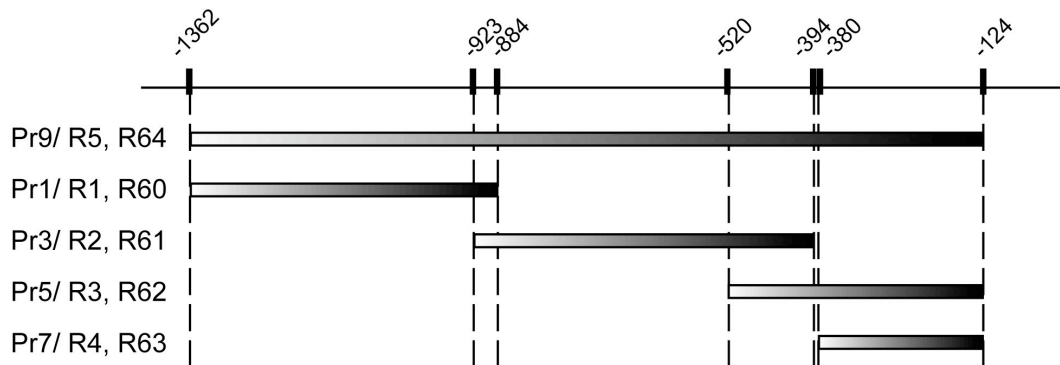


Abbildung 30: überlappende Fragmente des 5'-Promotors von *GL1*

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Subfragmente in den Entry-Vektoren Pr1, Pr3, Pr5, Pr7 des 5'-Promotors des *GLABRA1* Gens im Vergleich zum 5'-Gesamtpromotor (Pr9). Nebenstehend sind zum einen die zugehörigen GUS-Konstrukte R5, R1, R2, R3 und R4 sowie zum anderen die Rettungskonstrukte R64, R60, R61, R62 und R63 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Die GUS-Analyse der Pflanzen R2 (Pr3) lieferte keine Färbung (ohne Abb.). Die Pflanzen R1 (Pr1, Abb. 31A-C) und R3 (Pr5, Abb. 31D-F) ergaben Färbung in den jungen Blättern, die in älteren Blattteilen bereits verschwand. Die Expression in den Trichomen von R1 Pflanzen war bereits bei der Initiation zu erkennen und blieb bis zur Phase 6 der Trichomentwicklung erhalten (Abb. 31A, B), war aber in adulten Trichomen nicht mehr zu sehen (Abb. 31C). Außerdem konnte man GUS-Färbung an den lateralen Petiolen feststellen. Bei R3 Pflanzen war die Expression in Trichomen erst ab Phase 3 zu erkennen (Beginn der Verzweigungen, Abb. 31 D, E) und terminierte in der letzten Phase 6 der Trichomentwicklung (Abb. 31F). Das im Vergleich zu R3 kürzere Konstrukt R4 (Pr7) zeigte ebenfalls Expression in den Blättern der entsprechenden Pflanzen (Abb. 31G-I), die in sehr jungen Blättern schwächer als in R3 Pflanzen war, aber in älteren Blättern länger erhalten blieb (vgl. Abb. 31D-F und 31G-I). Die Expression in Trichomen von R4 (Pr7) Pflanzen war gegenüber

R3 (Pr5) minimiert und gerade in jungen Trichomen kaum zu erkennen. Man konnte sie in Phase 5 und 6 der Trichomentwicklung schwach erkennen (Abb. 31G und H). Die Pflanzen R3 und R4 zeigten neben der bereits beschriebenen Expression starke GUS-Färbung in den Stipeln, die auch in R5 (Pr9) Pflanzen (vgl. Abb. 13) wiederzufinden war. Alle drei Konstrukte wiesen generell eine schwächere Expression als das zu vergleichende Konstrukt R5 mit dem Gesamtpromotorfragment Pr9 auf: Für R1 (Pr1) konnte nur in einem Drittel der Pflanzenlinien Expression in Blättern und Trichomen nachgewiesen werden, während alle anderen keine GUS-Färbung aufwiesen. Für R3 und R4 war der Anteil mit einem Zehntel der Linien noch geringer, wobei alle übrigen Pflanzen ausschließlich stipulär exprimierten (Abb. 31J, K).

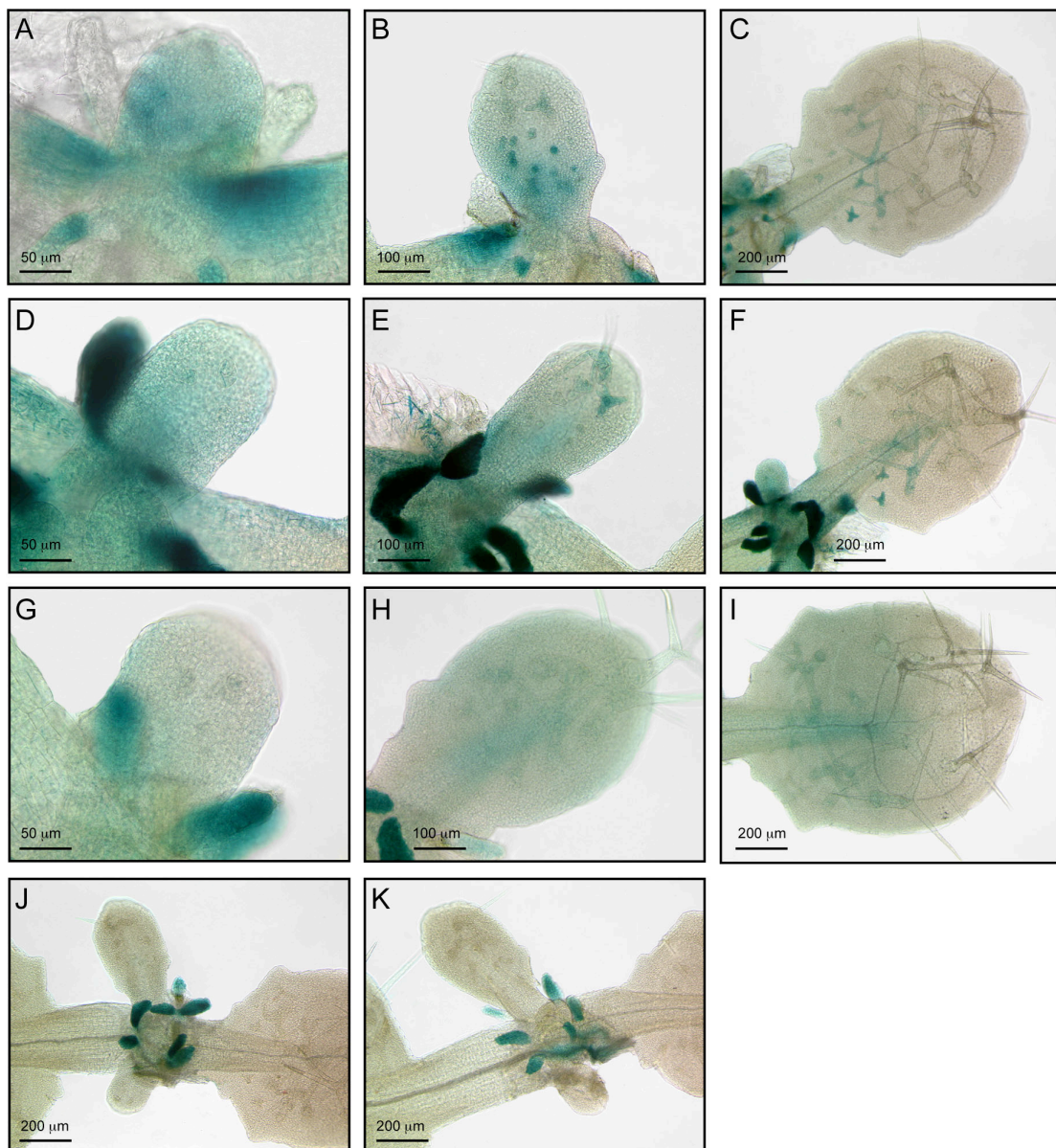


Abbildung 31: Expression der Konstrukte R1, R3 und R4 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotor-Subfragmente des *GLABRA1* Gens mit den Konstrukten R1 (A-C), R3 (D-F), R4 (G-I) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien dargestellt. In J und K sieht man jeweils Pflanzen mit den Konstrukten R3 bzw. R4, die wie der überwiegende Anteil der transgenen Linien ausschließliche Expression in den Stipeln zeigen.

Die Untersuchungen der GUS-Expression der Pflanzen, die den 3'-Enhancer in *in Vivo*- bzw. umgekehrter Richtung in 5'-Position in Kombination mit den 4 Subfragmenten des 5'-Promotors (Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7) tragen, waren nicht zu unterscheiden von den Pflanzen R37 und R38 mit ausschließlich 3'-Enhancer (R7 bis R10 und R12 bis R15, ohne Abb.). Dadurch wurde deutlich, dass die Regulation der GUS-Expression durch den 3'-Enhancer alle anderen regulatorischen Informationen auf GUS-Expressionsebene überdeckt.

Um die Funktion der 5'-Subfragmente für die Musterbildung einzuschätzen, wurden Rettungskonstrukte hergestellt (Abb. 32), die durch die Expression der GL1-cDNA das *gl1(39F12)* Allel komplementieren sollten.

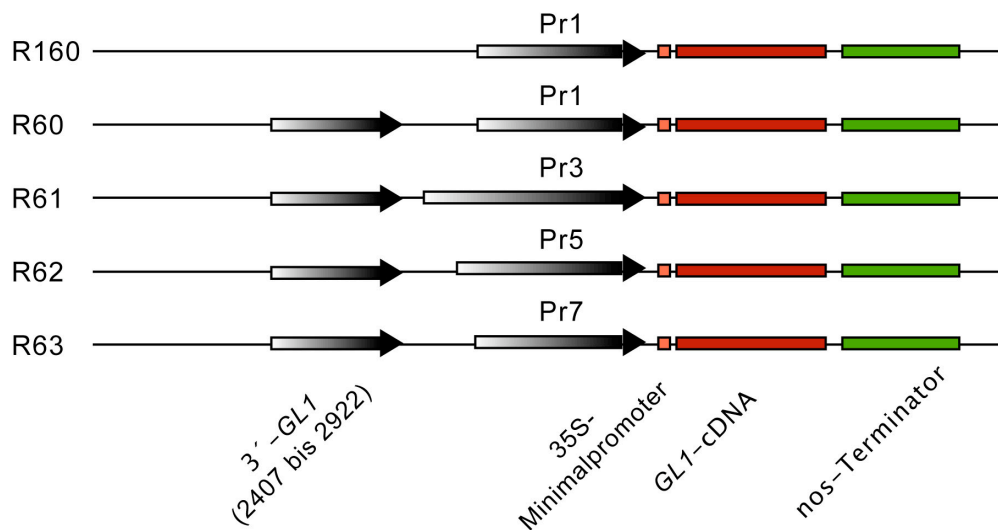


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R160 und R60 bis R63

Fusionen des 3'-Enhancers in *in Vivo*-Richtung und den verschiedenen, regulatorischen Bereiche des 5'-Promotors von *GL1* mit dem 35S-Minimalpromotor und dem GUS-Gen der Konstrukte R160 und R60 bis R63. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Die Analyse der 3'-Enhancer unabhängigen Rettungseffizienz wurde nur für das Fragment Pr1 mit dem Konstrukt R160 durchgeführt. Dieses Konstrukt zeigte wie der 5'-Gesamtpromotor (Pr9 in R66) keine Rettung (vgl. Tab. 5 mit Tab. 1). Die 4 Promotorfragmente Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7 wurden außerdem in Kombination mit dem vorgeschalteten 3'-Enhancer in *in Vivo*-Orientierung und der *GL1*-cDNA zur Komplementierung des *gl1(39F12)* Allels genutzt (Abb. 32).

Das distale Konstrukt R60 (Pr1 mit 3'-Enhancer, Abb. 33) zeigte eine sehr gute Rettungseffizienz, die der des 5'-Gesamtpromotors (Pr9) in Kombination mit 3'-Enhancer (R64) vergleichbar war (vgl. Abb. 17). Die maximale Trichomzahl auf Blatt1, 2, 3 und 4 für R60 betrug 12, 13, 29 und 34 (Tab. 5) und war damit geringfügig höher als bei der Rettung mit R64 (vgl. Tab. 1).

Betrachtete man die Verteilung der Trichomzahlen über die T1-Pflanzen auf dem jeweiligen Blättern 1-4 für das Konstrukt R61 (Pr3 mit 3'-Enhancer), zeigte sich eine Abschwächung der Rettung im Vergleich zum Konstrukt R65 (nur 3'-Enhancer, vgl. Abb. 17). Höhere Trichomzahlen

waren deutlich geringer (Abb. 33), allerdings entsprachen die maximalen Trichomzahlen mit 4, 8, 17 und 24 auf jeweils Blatt 1-4 denen von R65 (vgl. Tab. 1).

Die Rettungseffizienzen der Konstrukte R62 und R63 (Pr5 und Pr7 mit 3'-Enhancer) waren fast identisch. Die maximalen Trichomzahlen betrugen 8, 8, 24 und 35 für R62 und 9, 9, 22, 30 für R63 auf Blatt 1-4 und entsprachen damit ungefähr denen von R64 (Pr9 mit 3'-Enhancer, vgl. Tab. 1). Bei der Verteilung der Trichomzahlen über Blatt 1, 2, 3 oder 4 für R60 (Pr1 mit 3'-Enhancer) und R64 (Pr9 mit 3'-Enhancer) wiesen mehr T1-Pflanzen höhere Anzahlen auf als mit R62 (Pr5 mit 3'-Enhancer) und R63 (Pr7 mit 3'-Enhancer) (s. Abb. 33 und Abb. 17).

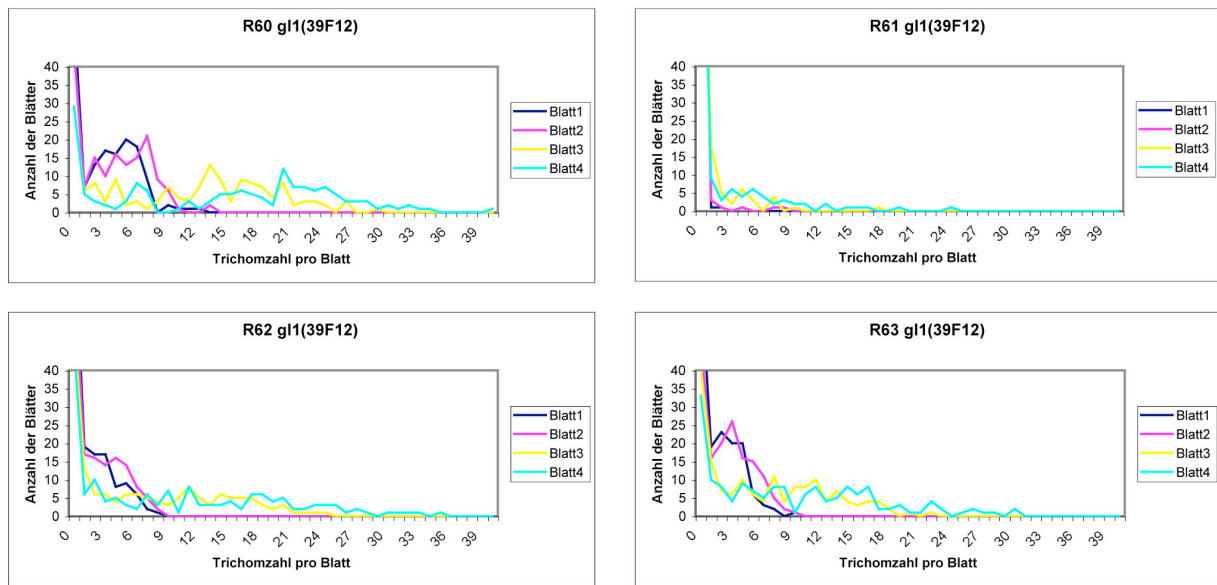


Abbildung 33: Rettungseffizienz der transgenen *g1* Pflanzen mit den Konstrukten R60, R61, R62 und R63

Darstellung der Rettungseffizienz der 5'-Promotorsubfragmente Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7 in Kombination mit vorgeschaltetem 3'-Enhancer von *GL1* in 5'-Position in *in Vivo*-Richtung in den Konstrukten R60 bis R63 in *g1(39F12)* Hintergrund. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1,2,3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation (R64-R66 n = 160).

Tabelle 5: Maximale Trichomzahlen der transgenen *g1* Pflanzen mit den Konstrukten R60 bis R63 und R160 auf den ersten vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
Ler	12	13	29	40
R60 <i>g1(39F12)</i>	12	13	29	34
R160 <i>g1(39F12)</i>	0	0	0	0
R61 <i>g1(39F12)</i>	4	8	17	24
R62 <i>g1(39F12)</i>	8	8	24	35
R63 <i>g1(39F12)</i>	9	9	22	30

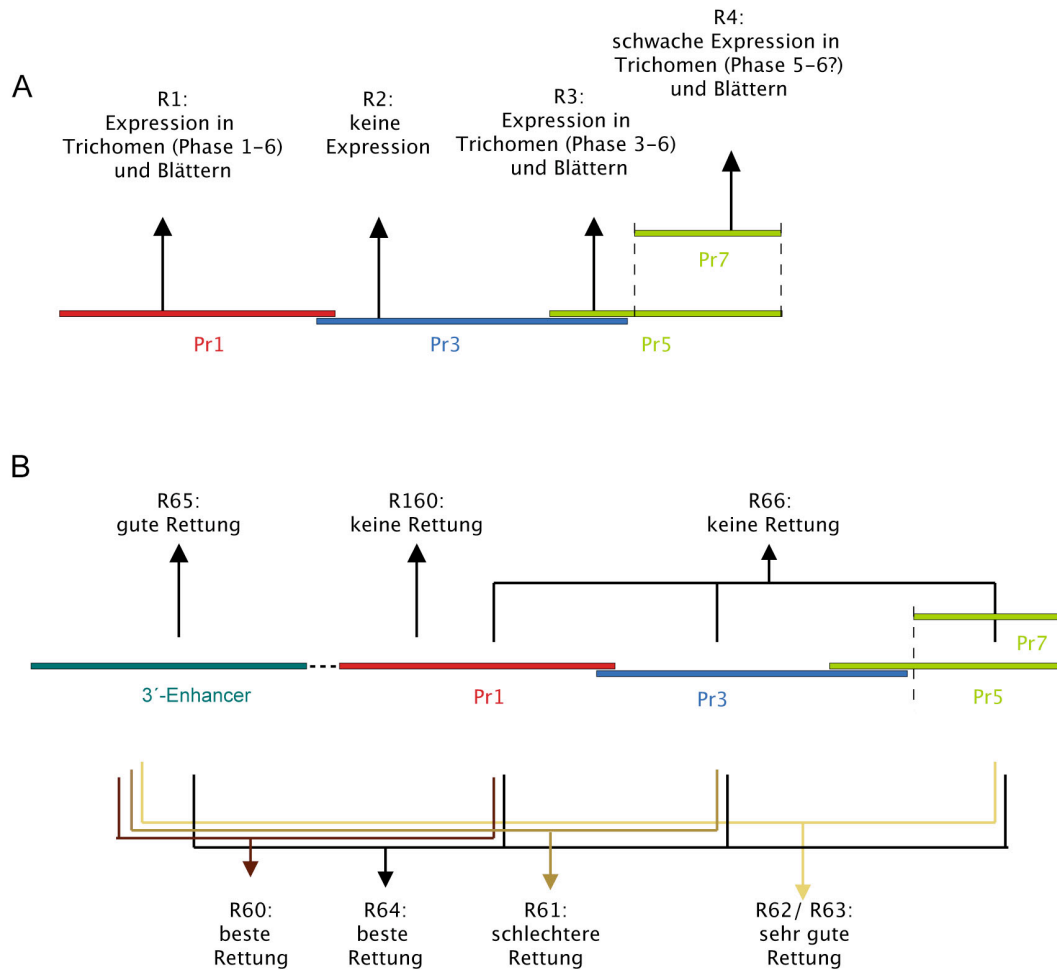


Abbildung 34: Zusammenfassung der Ergebnisse für die 5'-Promotorfragmente von GL1

Dargestellt sind die Ergebnisse der GUS-Analyse (A) und der Rettungsanalyse (B), die sich für die Promotorfragmente Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7 ergaben.

Zusammenfassend konnte man erkennen (s. Abb. 34), dass die Promotorfragmente Pr1 und Pr5 spezifische Information für die Expression in Trichomen und jungen Blättern tragen, wie die GUS-Analyse zeigte. Dabei vermittelte Pr1 im Gegensatz zu Pr5 frühe Trichomexpression, d.h. auch in Phase 1 und 2 der Trichommorphogenese. Beide Fragmente vermitteln eine strenge Termination in Phase 6. Die Einschränkung des Fragments Pr5 auf Pr7 lieferte nur noch schwache Expression in Blättern und in den Trichomen. Das mittlere Fragment Pr3 besaß keine spezifische Information vermittelte aber Inhibition, wie die Rettungsanalyse mit dem 3'-Enhancer zeigte. Wichtig ist, dass die 5'-Fragmente mit dem 3'-Enhancer andere Ergebnisse für die Rettungseffizienz lieferten als jeweils die einzelnen Fragmente, auch wenn die GUS-Expression der Kombinationen immer der des 3'-Enhancers entsprach. Daraus kann man einen Gradienten der Rettungseffizienz herleiten, der sich auf die Verteilung der Trichomzahlen auf den ersten vier Rosettenblättern bezieht:

$$\begin{aligned} &\mathbf{R66} \text{ (Pr9)} < \mathbf{R61} \text{ (Pr3+3'-Enhancer)} < \mathbf{R65} \text{ (3'-Enhancer)} < \mathbf{R63} \text{ (Pr7+3'-Enhancer)} \\ &\leq \mathbf{R62} \text{ (Pr5+3'-Enhancer)} < \mathbf{R60} \text{ (Pr1+3'-Enhancer)} = \mathbf{R64} \text{ (Pr9+3'-Enhancer)}. \end{aligned}$$

2.3.7 Kombinatorik der unterschiedlichen 5'-Subfragmente des *GL1*-Gens

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Subfragmente des 5'-Promotors des *GLABRA1*-Gens wurden Fusionen (Abb. 35) der Subfragmente Pr1, Pr3, Pr5, Pr7 und der proximalen Region von -123 bis -17 (prox) hergestellt und ihr Einfluss auf die GUS-Expression untersucht.

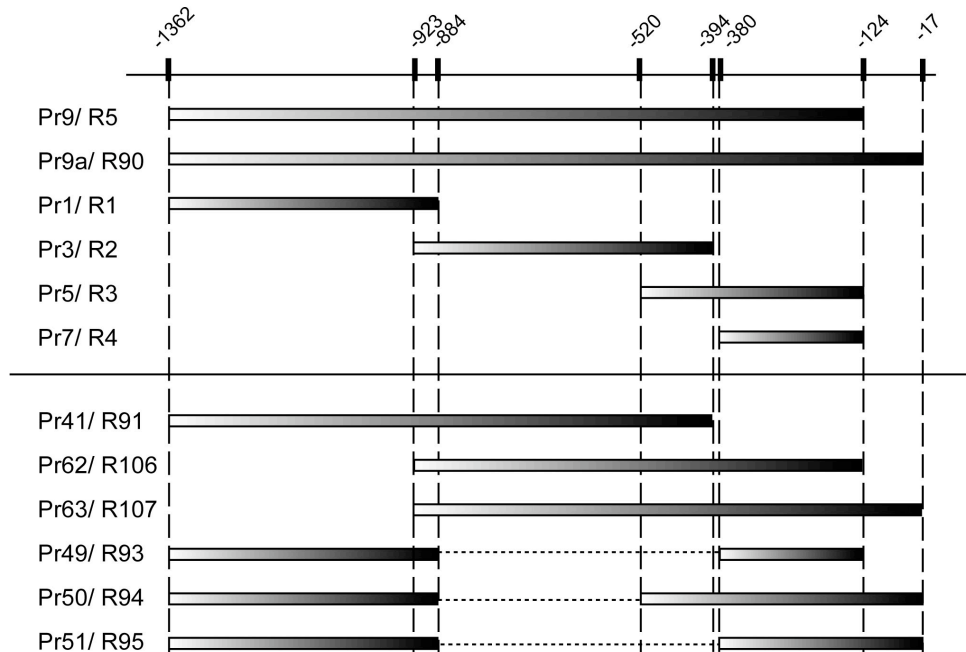


Abbildung 35: Fusionen der Fragmente des 5'-Promotors von *GL1*

Im oberen Teil der Abbildung sind der 5'-Gesamtpromotor Pr9 bzw. Pr9a und die Fragmente Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7 zum Vergleich dargestellt. In dem Entry-Vektor Pr41 wurde der Bereich beginnend mit Subfragment Pr1 bis zum Ende von Pr3 amplifiziert. In Pr62 und Pr63 wurde der Bereich von Subfragment Pr3 und Pr5, sowie von Pr3 und Pr5 mit zusätzlich der proximalen Sequenz von -123 bis -17 benutzt. In den Entry-Vektoren Pr 49, 50 und 51 wurde das Subfragment Pr1 zum einen mit Pr7 und zum anderen mit den Varianten von Pr5 und Pr7, die zusätzlich die Sequenz von -123 bis -17 tragen, fusioniert. Nebstehend sind die GUS-Vergleichskonstrukte R5, R90, R1, R2, R3 und R4, sowie die GUS-Konstrukte mit den fusionierten Promotorfragmenten R91, R106, R107, R93, R94 und R95 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*

Zunächst sollen die Fusionen des bei den Rettungsuntersuchungen inhibitorisch wirkenden Promotorfragments Pr3, welches allein in den Pflanzen R2 keine Expression zeigte, mit den anderen 5'-Subfragmenten betrachtet werden: Die GUS-Expression der Pflanzen R91 (Pr41 aus Pr1+Pr3) (Abb. 36A-C) zeigte im Gegensatz zu R1 Pflanzen (nur Pr1, vgl. Abb. 31A-C) keine Expression im Blatt. Nur die Expression in den lateralen Petiolen konnte erhalten werden. In den Pflanzen R106 (Pr62 aus Pr3+Pr5) und R107 (Pr63 aus Pr3+Pr5+prox) (Abb. 36D-I) war, wie in dem zu vergleichenden Konstrukt R3 (nur Pr5, vgl. Abb. 31D-F), die Expression in Stipeln sehr stark und auch die Expression in den Blättern blieb erhalten. Im Gegensatz zu R3 (Pr5) konnte in R106 keine Expression in den Trichomen detektiert werden. Das Konstrukt 107 mit der proximalen Sequenz zeigte hingegen eine schwache Expression in den sich entwickelnden Trichomen von der Initiation bis zu Reife (Abb. 36H, I).

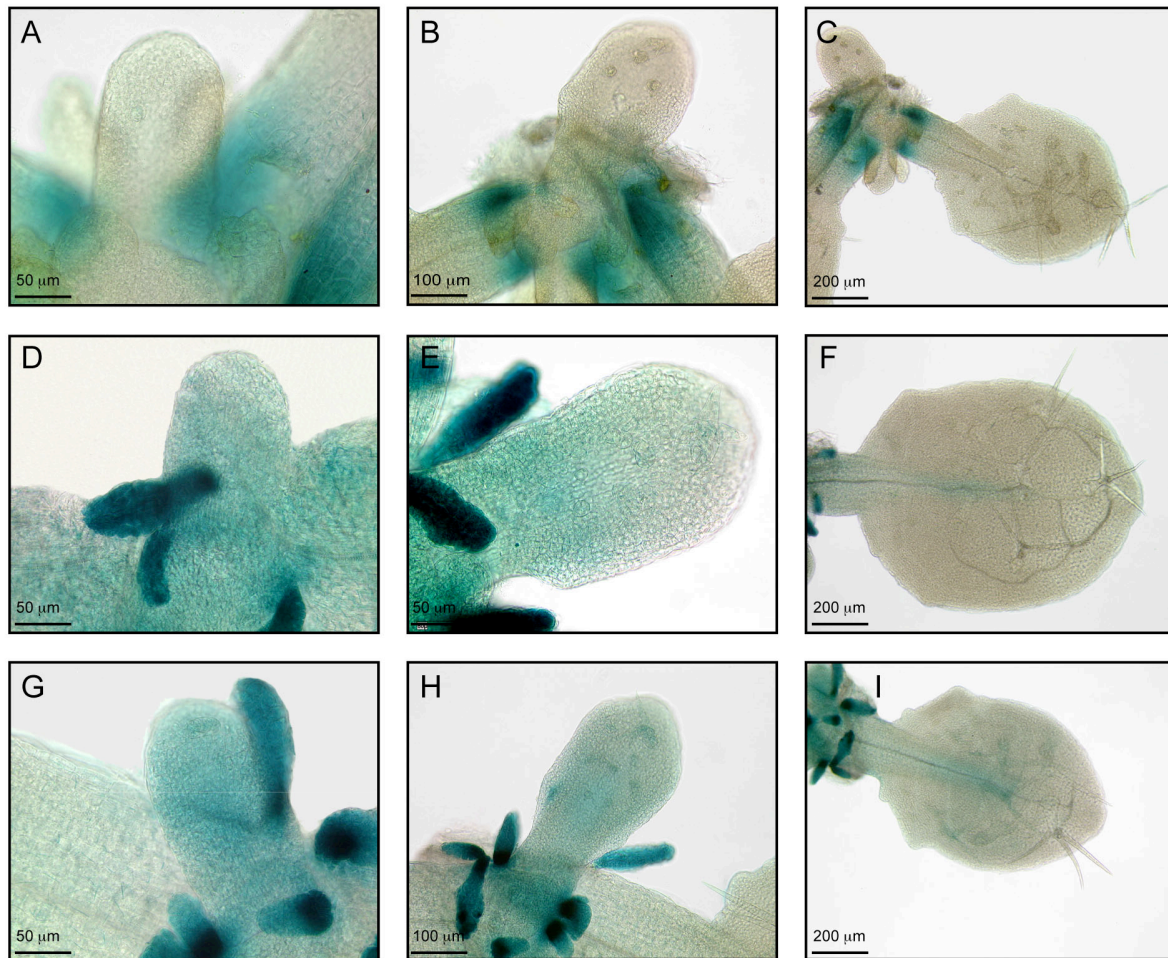


Abbildung 36: Expression der Konstrukte R91, R106 und R107 in Rosettenblättern von *Ler* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression kombinierter Subfragmente des 5'-Promotor des *GLABRA1* Gens mit den Konstrukten R91 (A-C), R106 (D-F), R107 (G-I) in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien dargestellt.

Die Pflanzen R93 (Pr49 aus Pr1+Pr7), R94 (Pr50 aus Pr1+Pr5+prox) und R95 (Pr51 aus Pr1+Pr7+prox) zeigten jeweils starke Expression in den jungen Blättern (Abb. 37A, B, D, E, G, H). Für die Pflanzen R94 und R95, die beide die zusätzlich proximale Sequenz tragen, konnte auch noch in etwas älteren Blättern Expression detektiert werden (Abb. 37F, I), die in R93 (Abb. 37C) nur noch schwach zu erkennen war. Im Gegensatz zu den Pflanzen R1, R3 und R4 (vgl. Abb. 31) zeigten R93, R94 und R95 sehr viel stärkere Expression in den Trichomen, wobei diese den Zeitraum von der Initiation bis zum adulten Trichom umfasste. Die Expression von R93 war vergleichbar der von R5 (Pr9, vgl. Abb. 13), hingegen hielten R94 und R95 die Expression in den Blättern länger aufrecht als R5.

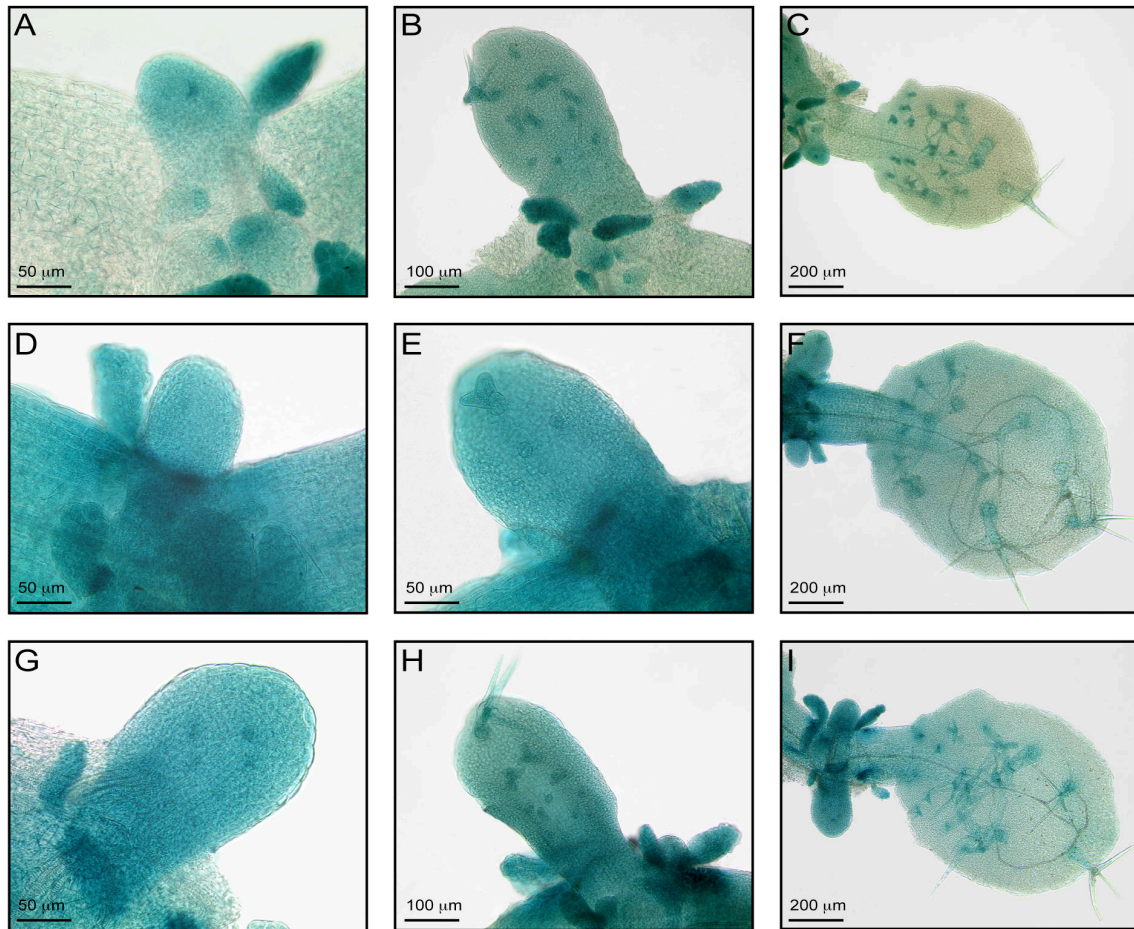


Abbildung 37: Expression der Konstrukte R93, R94 und R95 in Rosettenblättern von *Ler* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression kombinierter Subfragmente des 5'-Promotor des *GLABRA1* Gens mit den Konstrukten R93 (A-C), R94 (D-F), R95 (G-I) in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien dargestellt.

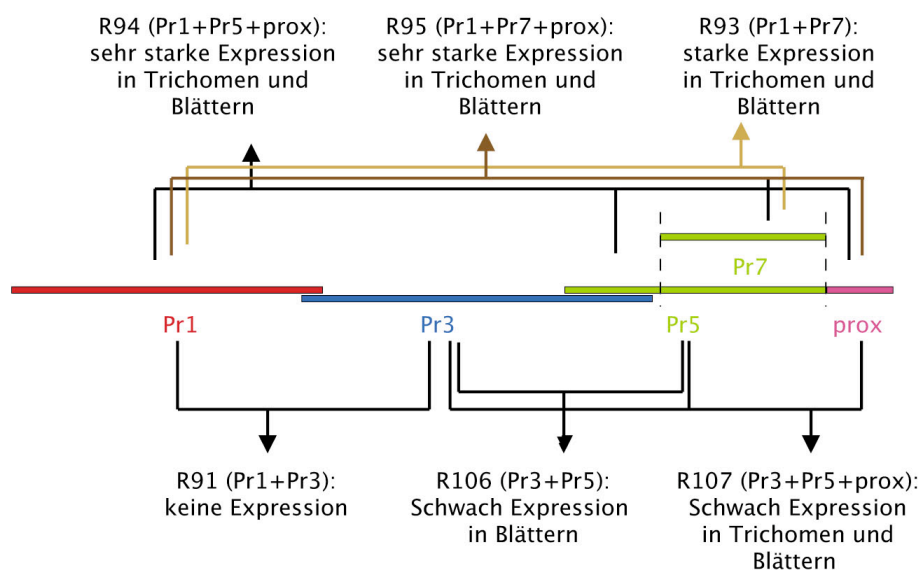


Abbildung 38: Zusammenfassung der Ergebnisse der Fusionen der 5'-Fragmente von *GL1*

Dargestellt sind die Ergebnisse der GUS-Analyse, die sich für die Promotorfragmente Pr1, Pr3, Pr5 und Pr7 und dem proximalen Fragment von -124 bis -17 (prox) ergaben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten (s. Abb. 38), dass die Subfragmente Pr1 und Pr5 ihre Wirkung gegenseitig verstärken konnten. Das Subfragment Pr3, das isoliert keine Expression lieferte, wirkte inhibitorisch auf die Regulation der anderen 5'-Subfragmente Pr1 und Pr5. Der zusätzlich untersuchte, proximale Sequenzbereich von -123 bis -17 (prox) lieferte als Verlängerung der Subfragmente Pr5, Pr7 und Pr9 eine Verstärkung der Trichomexpression bzw. der basalen Expression.

2.3.8 Weitere Untersuchung des 5'-Subfragments Pr1 des *GL1* Gens

Aufgrund der guten, stabilen Expression des Subfragments Pr1 in Trichomen im Gegensatz zu den anderen untersuchten Subfragmenten des 5'-Promotors und einer mit dem Gesamtpromotor Pr9 vergleichbare Rettungseffizienz in Kombination mit dem 3'-Enhancer, wurde dieses Subfragment genauer untersucht. Dabei wurde Pr1 in drei überlappende Fragmente unterteilt (Pr82, Pr84, Pr85). Des Weiteren wurde Pr83 als eine Deletion von Pr84, und Pr86 als eine Deletion von Pr85 hergestellt (Abb. 39). In diesen deletierten Sequenzbereichen ist ein Ökotypen-Unterschied lokalisiert, bei dem in *Ler*-Hintergrund im Gegensatz zu *Col* eine fünffache AT-Wiederholung fehlt (vgl. Abb. 41.)

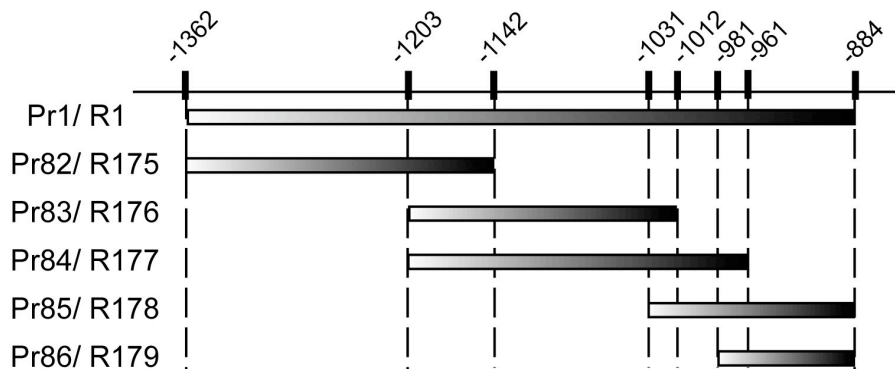


Abbildung 39: Überlappende Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr1 von *GL1*

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Subfragmente in den Entry-Vektoren Pr82 bis Pr86 des 5'-Promotors des *GLABRA1* Gens im Vergleich zum distalen 5'-Subfragment Pr1. Nebenstehend sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R1, R175 bis R179 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

GUS-Expression konnte nur für die Pflanzen R176 und R177, die die mittleren Fragmente Pr83 und Pr84 tragen, nachgewiesen werden. Dabei war die Expression auf die jungen Trichome auf die Phase 1 bis 4 der Trichomentwicklung beschränkt (Abb. 40). Adulte, alte Trichome zeigten keine Expression, so dass die zeitliche Expression vergleichbar den Pflanzen R1 (Pr1, Abb. 31) war. Da die Expression erst nach zweitägiger Färbung lokalisiert werden konnte, war das Expressionslevel folglich relativ niedrig. Die ubiquitäre Expression in den Blättern konnte durch keines der fünf Konstrukte gezeigt werden. Die vollständige Funktionalität des Fragments Pr1 konnte also nur

durch seine gesamte Sequenz erhalten werden.

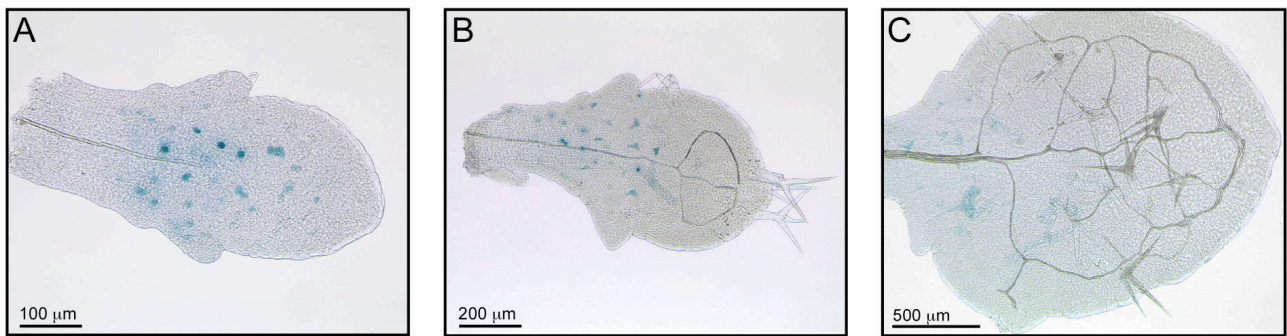


Abbildung 40: Expression des Konstruktes R176 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

GUS-Expression nach 2 Tagen Färbung. Es sind drei verschiedene Blattstadien dargestellt.

2.3.9 *In Silico* Untersuchung des 5'-Promotors von *GL1*

Der 5'-Promotor von *GLABRA1* (-1380 bis -1 der Col-Sequenz) wurde durch eine Analyse in der PLACE-Datenbank (Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements) untersucht. Dabei konnten eine Vielzahl von cis-regulatorischen Elementen identifiziert werden, die im Zusammenhang mit den untersuchten Fragmenten und ihren Deletionen dargestellt wurden (Abb. 41). Da zurzeit nicht klar ist, durch welche übergeordneten Signale, außer GA, *GL1* reguliert werden könnte, sollte keines der Elemente vorselektiert werden. Die Datenbank-Analyse in Kombination mit den Ergebnissen der GUS-Expressions- und Rettungsstudien deutet auf eine komplexe Regulation durch den 5'-Promotor hin. Eine kritische Auseinandersetzung kann der Diskussion entnommen werden.

Viele der regulatorischen Elemente können in Kategorien zusammengefasst werden, die eine Zuordnung zu verschiedenen übergeordneten Regulationswegen liefert: ABA-, GA-, Auxin-, Jasmonat und Salicylsäure-Induktion sowie Licht-, Phytochrom-, Trockenstress-, Abwehr-, Hyposmolarität und Niedrigtemperatur-Regulation. Diese Elemente sind meistens über viele der untersuchten Fragmente verteilt (s. Tab. 6). Die Funktionen der übrigen Elemente sind vielseitig und können der Abb. 41 entnommen werden. Die Elemente, die für den inhibitorisch wirkenden Bereich von Fragment Pr3 (s. 2.3.6 und 2.3.7) und den aktivierenden Bereich des proximalen Fragments verantwortlich (s. 2.3.4) sein könnten, können ebenfalls der Tab. 6 entnommen werden. Die Elemente, die in Pr1 (s. 2.3.8) und Pr5 (s. 2.3.6) spezifische Expression oder kombinatorisch verstärkende Expression vermitteln könnten, sind in Tab. 7 gegenüber gestellt. Dabei sollten die Elemente in den kleineren Fragmenten Pr83 bzw. Pr7 die spezifische, regulatorische Information beinhalten, und die Sequenzen außerhalb die verstärkende Information tragen.

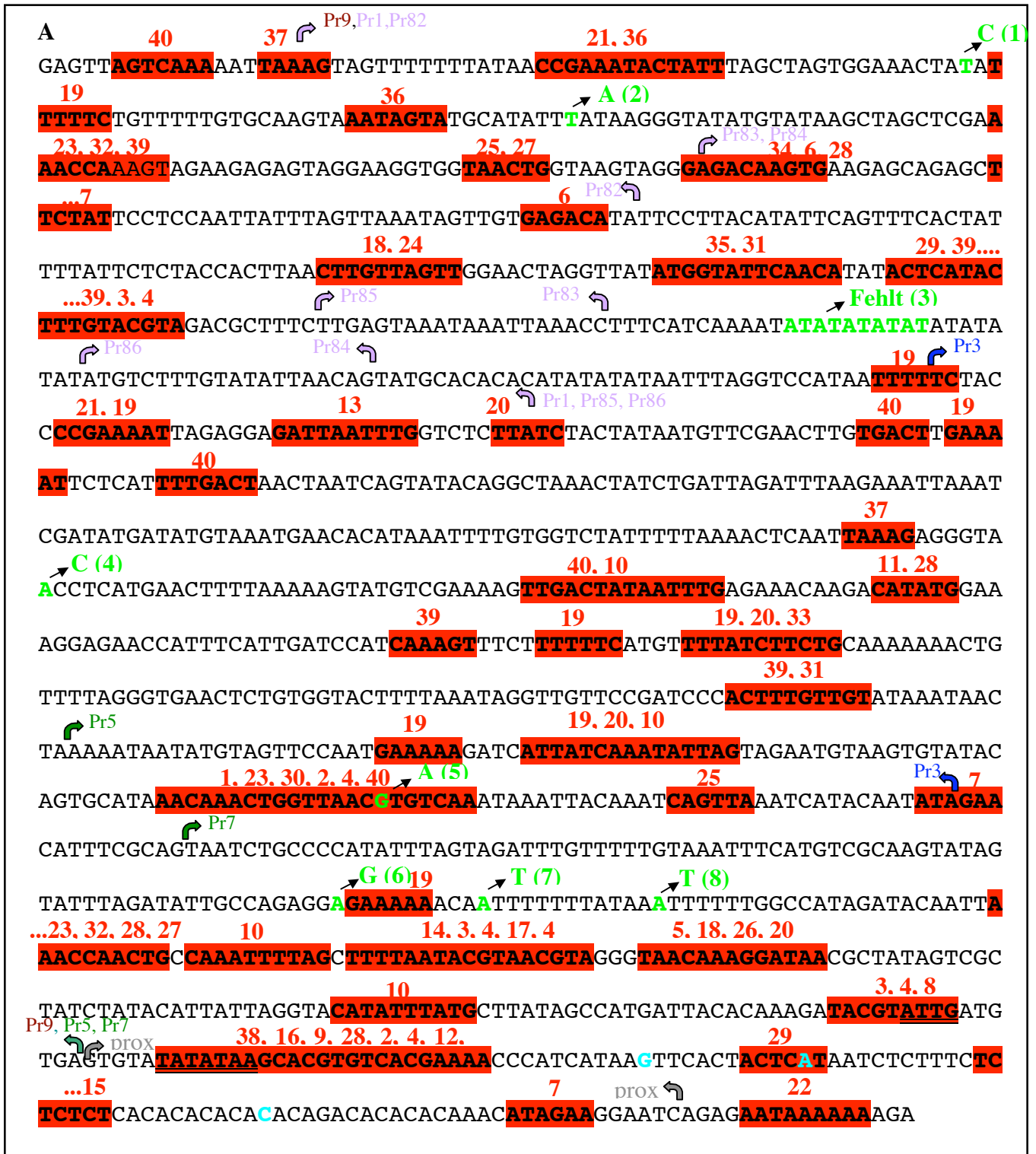


Abbildung 41: Zuordnung der durch PLACE identifizierte, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotors von GL1

B

Nr.	Cis-Element	Sequenz	Bindender Faktor	Organismus	Gen/ Funktion
1	AACACOREOSGLUB1	AACAAAC		Oryza sativa	Glutelin, Endosperm Spezifität
2	ABRELATERD1	ACGTG	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1, Trockenstress und Dunkelinduzierte Seneszenz
	ACGTABREMOTIFA20SEN	ACGTGKC		Oryza sativa, A. thaliana	OSEM, RD29A
3	GADOWNAT	ACGTGTC		Arabidopsis thaliana	GA Runterregulation (Gene des D1 Clusters)
4	ACGTABOX	TACGTA	bZIP	Oryza sativa	
5	ACGTATERD1	ACGT	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1
	AMYBOX1	TAACARA		Hordeum vulgare, Oryza sativa, Triticum aestivum	alpha-Amylase
6	ARFAT	TGTCTC	ARF1 (Auxin Response Factor)	Arabidopsis thaliana, Glycine max	Frühe Auxin-Response-Gene
7	BOXIINTPATPB	ATAGAA		Nicotiana tabacum	SAUR15A, NDE, GH3, D1, D4
8	CAATBOX1	CAAT		Viele Eukaryoten	Plastidiäres ATPB, plastidiäre NCII-Promotoren
9	CACGTGMOTIF (G-BOX)	CACGTG	GBF4, CrGBF1, CrGBF2	Arabidopsis thaliana	5'-Promotorregion, -80bp
			PTI4	Catharanthus roseus	beta-Phaseolin (Embryogenese)
10	CARGCW8GAT	CWVWWVWWV	AGL15 (MADS-BOX-TF)	Lycopersicon esculentum	STR
		WG		Arabidopsis thaliana	Abwehr bezogen
11	CATATGGMSAUR	CATATG		Glycine max	SAUR15A, Auxin-Antwort
12	CELLCYCLES	CACGAAAA		Saccharomyces cerevisiae	HO-Gene, Zellzyklus Aktivierung
13	CIANCADIANLELHC	CAANNNNATC		Lycopersicon esculentum	Lhc, Circadiane Expression
14	CONSERVED1INTZMATP1	ACGTATTAAAA		Zea mays	Mitochondriales ATP1 (-5 bis +6)
15	CTRMCA MV35S	TCTCTCTCT		CaMV	35S, 60bp hinter Transkriptionsstart, Verstärkende Wirkung
16	DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	bZIP: DPBF1,2	Daucus carota	DC3
			ABI5	Arabidopsis thaliana	
17	GARE2OSREPI	TAACGTA		Oryza sativa	REP1 (Gibberellin-Antwort)
18	GAREAT, MYBGAHV	TAACAAR		Arabidopsis thaliana	GA responsive Gene
19	GT1CONSENSUS	GRWAAW	GT1-BF	Hordeum vulgare	High pT alpha-Amylase
20	IBOXCORE	GATAAG	LeMYB1	Arabidopsis thaliana, u.a.	Licht-Regulation, SA-Induktion
				Lycopersicon esculentum	rbcS
21	LTREIHVBLT49	CCGAAA		Arabidopsis thaliana	
22	MARTBOX	TTWTWTTWTT		Hordeum vulgare	bet4.9, Niedrigtemperatur-Antwort
23	MYBIAT	WAACCA	MYB	Drosophila	„Scaffold Attachment Region“
24	MYB1LEPR	GTTAGTT	PTI4	Arabidopsis thaliana	z.B. AtRD22
25	MYB2AT	TAACTG	ATMYB2	Lycopersicon esculentum	Abwehr bezogen
26	MYBST1	GGATA	MYB	Arabidopsis thaliana	Trockenstress, ABA-Signaltransduktion
27	MYB2CONSENSUSAT	YAAACKG	ATMYB2	Solanum tuberosum	
28	MYCCONSENSUSAT	CANNTG	ATMYC2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
	EBOXXNAPA	CANNTG		Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
29	PREATPRODH	ACTCAT		Arabidopsis thaliana	ProDH, Prolin oder hypoosmolare Antwort
30	QARBNEXTA	AACGTGT		Brassica napus	EXTA

	T/GBOXATPIN2	AACGTG	JAMYC2, JAMYC10	Lycopersicon esculentum Arabidopsis thaliana Arabidopsis thaliana	PIN2 (Proteinase-InhibitorII), LAP (Leucin-aminopeptidase), Jasmonat-Induktion Element RAV1A in Kombination mit RAV1B In Rosettenblättern und Wurzel Lhcb21, Phytochrom-Regulation RTBV, Phloem spezifische Expression (-143 bis -135)
31	RAV1AAT	CAACA	RAV1		
32	REALPHALGLHCB21	AACCAA		Lemna gibba	
33	RGATAOS	CAGAAAGATA	GATA	Oryza sativa	
			Bindungsfaktor		
34	SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	SEBF	Solanum tuberosum	PR-10A, Pathogenabwehr (-45 bis-39)
35	S1FSORPL21	ATGGTATT	S1F	Spinacia oleracea	Plastidiäres RPL21, negatives Element
36	SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	SP8BF	Ipomoea batatas	Sporamin, beta-Amylase
37	TAAAGSTKST1	TAAAG	DOF1	Solanum tuberosum	KST1, Schließzellen spezifische Expression
38	TATABOX4	TATATAA		Ipomoea batatas	Sporamin
				Phaseolus vulgaris	Beta-Phaseolin
39	TBOXATGAPB	ACTTTG		Arabidopsis thaliana	GAPB (-94 bis -89, und -84 bis-79), lichtreguliert
40	W-BOX	(T)TTGACY	WRKY		
	WBOXPCWRKY1	TTTGACT	WRKY	Petroselinum crispum	WRKY1, WRKY3
	WBOXATNPR1	TTGAC	WRKY	Arabidopsis thaliana	NPR1 (+70 und +79), SA-Induktion
	WBOXHVISOI	TGACT	SUSIBA2	Hordeum vulgare	ISO1
	WBOXNTERF3	TGACY	WRKY	Nicotiana tabacum	ERF3, Verwundung
	WRKY71OS	TGAC	WRKY711	Oryza sativa	Amy32b, GA-Signaltransduktion

Abbildung 41: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotors von GL1

In A ist die gesamte Sequenz des 5'-Promotors von -1380 bis -1 bezogen auf den endogenen Translationsstart von GLABRA1 dargestellt. Die Nummern in rot geben die Zuweisung zu den in B aufgeführten, cis-regulatorischen Elementen an. Sie befinden sich über den entsprechenden rot unterlegten Nukleotiden, die das jeweilige Element charakterisieren. In türkis sind die 3 identifizierten Transkriptionsstartstellen markiert. Grün kennzeichnet die Nukleotide, die bei der Sequenzierung der Promotorfragmente eindeutige Ökotypen-Unterschiede zwischen der gezeigten Datenbanksequenz aus Col-Hintergrund zu der hier untersuchten Ler Sequenz aufweisen. Der jeweilige Ler-Nukleotidaustausch befindet sich diagonal über dem Col-Nukleotid und wurde mit einer Mutationsnummer ((1)-(8)) versehen. Die gebogenen Pfeile kennzeichnen den Anfang bzw. das Ende der Promotorfragmente, die jeweils daneben zu finden sind: Pr1 und dessen Unterfragmente Pr82-Pr86, Pr3, Pr5 und Pr7, Pr9 sowie das proximale Fragment (-123 bis -17), hier als prox bezeichnet.

In B sind die cis-regulatorischen Elemente mit zugehöriger Nukleotidsequenz, den bindenden Transkriptionsfaktoren (sofern bekannt), den Organismen, in den sie untersucht wurden, sowie das Gen, die Funktion bzw. der Stoffwechselweg, in dem sie identifiziert wurden, aufgelistet. Alle unwahrscheinlichen Elemente, wie z.B. PolyA-Signale, Pollen sowie Agrobacterium spezifische Elemente, vom Transkriptionsstart weiter entfernte TATA- und CAAT-Boxen wurden nicht in die Liste aufgenommen. Außerdem wurden die Bindungsstellen, die nur durch 4 Nukleotide gekennzeichnet (DOFCORE, ARR1AAT, CACTFTPPCA1, GATA-Box) sind, aufgrund ihrer Vielzahl außer Acht gelassen.

Tabelle 6: Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen 5'-Promotorfragmenten von *GL1*

Für jedes cis-regulatorische Element ist aufgelistet, wie oft es in dem jeweiligen Promotorfragment vorkommt. Die cis-Elemente sind funktionalen Kategorien zugeordnet, soweit dies möglich ist. Die Farbkodierung der Zellen spiegelt wider, in wie vielen der vier Fragmente ein spezifisches Element auftritt (vier, drei, zwei). Die Zahl in den Klammern entspricht der cis-Elementnummer in Abb. 41.

Funktionale Kategorie	Cis-Element	Pr1	zwischen Pr1 und Pr5	Pr5	prox
Expression		Trichome (Phase 1-6) und Blatt	Inhibitorische Aktivität	Trichome (Phase 3-6) und Blatt	Verstärkende Aktivität
ABA	ACGTATERD1 (4)	1	-	4	1
ABA	DPBFCOREDCDC3 (16)	-	-	-	1
ABA	MYB1AT (23)	1	-	2	-
ABA	MYB2CONSENSUSAT (27)	1	-	2	-
ABA, GA	ABRELATERD1 (2) ACGTABREMOTIFA2OSEN GADOWNAT	-	-	1	1
ABA, Licht	CACGTGMOTIF (G-BOX) (9)	-	-	-	1
Abwehr	MYBILEPR (24)	1	-	-	-
Abwehr	SEBFCONSSTPR10A (34)	1	-	-	-
Abwehr	W-BOX (40) WBOXPCWRKY1 WBOXATNPR1 WBOXHVIS01 WBOXNTERF3 WRKY71OS	-	3 1 2 3 3 -	1 - 1 - - -	1 - - - - -
Abwehr?	SP8BFIBSP8BIB (36)	2	-	-	-
Auxin	ARFAT (6)	2	-	-	-
Auxin	CATATGGMSAUR (11)	-	1	-	-
Circadian	CIACADIANLELHC (13)	1	-	-	-
GA	AMYBOX1 (5)	-	-	1	-
GA	GARE2OSREP1 (17)	-	-	1	-
GA	GAREAT, MYBGAHV (18)	1	-	1	-
Hypoosmolarität	PREATPROD1 (29)	1	-	-	1
Jasmonat	QARBNEXTA (30) T/GBOXATPIN2	-	-	1	-
Licht	IBOXCORE (20)	-	2	2	-
Licht	TBOXATGAPB (39)	2	2	-	-
Licht, SA	GT1CONSENSUS (19)	3	3	3	-
Niedrigtemperatur	LTRE1HVBLT49 (21)	2	-	-	-
Phytochrom	REALPHALGLHCB21 (32)	1	-	1	-
Trockenstress	MYB2AT (25)	1	-	1	-
Zellzyklus	CELLCYCLESC (12)	-	-	-	1
	AACACOREOSGLUB1 (1)	-	-	1	-
	ACGTABOX (3)	1	-	2	-
	BOXINTPATPB (7)	1	-	2	-
	CAATBOX1 (8)	-	-	1	-
	CARGCW8GAT (10)	-	2	3	-
	CONSERVED11NTZMATP1 (14)	-	-	1	-
	CTRMCMV35S (15)	-	-	-	1
	MYBST1 (26)	-	-	1	-
	MYCCONSUSAT (28)	1	1	1	1
	RAV1AAT (31)	1	1	-	-
	RGATAOS (33)	-	1	-	-
	SIFSORPL21 (35)	1	-	-	-
	TAAAGSTKST1 (37)	-	1	-	-
	TATABOX4 (38)	-	-	-	1

Tabelle 7: Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den 5'-Promotorfragmenten Pr83 zu Pr1 und Pr7 zu Pr5

Verglichen wird jeweils der Bereich, der eine schwache spezifische Expression (Pr83 bzw. Pr7) liefert, mit dem entsprechenden Bereich, der die Expression verstärken kann. Im Fragment Pr1 liefert Pr83 die spezifische Expression, sowie das etwas größere Fragment Pr84, deshalb wird die Sequenz außerhalb von Pr84 als verstärkend vorausgesetzt. Für jedes cis-regulatorische Element ist aufgelistet, wie oft es in dem jeweiligen Promotorfragment vorkommt. Die cis-Elemente sind funktionalen Kategorien zugeordnet, soweit dies möglich ist. Die gelbe Farbkodierung der Zellen spiegelt wider, ob das jeweilige cis-Element in den zu vergleichenden Bereichen vorkommt. Die Zahl in Klammern entspricht der cis-Elementnummer in Abb. 41.

Funktionale Kategorie	Cis-Element	Pr83	Pr1 außerhalb von Pr84
Expression		Trichome (Phase 1-4)	
ABA	ACGTATERD1 (4)	1	-
ABA	MYBIAT (23)	-	1
ABA	MYB2CONSENSUSAT (27)	-	1
Abwehr	MYB1LEPR (24)	1	-
Abwehr	SEBFCONSSTPR10A (34)	-	1
Abwehr	SP8BFIBSP8BIB (36)	-	2
Auxin	ARFAT (6)	2	-
Circadian	CIACADIANLELHC (13)	-	1
GA	GAREAT, MYBGAHV (17)	1	-
Hypoosmolarität	PREATPRODHD (29)	1	-
Licht	TBOXATGAPB (39)	1	-
Licht, SA	GT1CONSENSUS (19)	-	3
Niedrigtemperatur	LTRE1HVBTL49 (21)	-	2
Phytochrom	REALPHALGLHCB21 (32)	-	1
Trockenstress	MYB2AT (25)	-	1
	ACGTABOX (3)	1	-
	BOXIINTPATPB (7)	1	-
	MYCCONSensusAT (28)	1	-
	EBOXNNAPA		
	RAV1AAT (31)	1	
	S1FSORPL21 (35)	1	-

Funktionale Kategorie	Cis-Element	Pr5 außerhalb von Pr7	Pr7
Expression			Schwach Trichome (Phase 5-6?) und Blatt
ABA	ACGTATERD1 (4)	1	3
ABA	MYBIAT (23)	1	1
ABA	MYB2CONSENSUSAT (27)	1	1
ABA,	ABRELATERD1 (2)	1	-
GA	ACGTABREMOTIFA2OSEN		
	GADOWNAT		
Abwehr	W-BOX (40)	1	-
GA	AMYBOX1 (5)	-	1
GA	GARE2OSREP1 (17)	-	1
GA	GAREAT, MYBGAHV (18)	-	1
	QARBNEXTA (30)	1	-
Jasmonat	T/GBOXATPIN2		
Licht	IBOXCORE (20)	1	1
Licht, SA	GT1CONSENSUS (19)	2	1
Phytochrom	REALPHALGLHCB21 (32)	-	1
Trockenstress	MYB2AT (25)	1	-
	AACACOREOSGLUB1 (1)	1	-
	ACGTABOX (3)	-	2
	BOXIINTPATPB (7)	1	-
	CAATBOX1 (8)	-	1
	CARGCW8GAT (10)	1	2
	CONSERVED11NTZMATP1 (14)	-	1
	MYBST1 (26)	-	1
	MYCCONSensusAT (28)	-	1

2.3.10 Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche des 3'-Enhancers von *GL1*

Wie zuvor gezeigt wurde, war der 3'-Enhancer von *GLABRA1* allein in der Lage Expression in die Blätter und Trichome zu dirigieren. Da die dafür genutzte Sequenz einen Bereich von 516 Nukleotiden umfasst, sollte die regulatorische Region genauer kartiert werden. Der 3'-Enhancer wurde in drei überlappende Fragmente unterteilt. Das erste Subfragment-28 enthält mit 197 Nukleotiden die Sequenz von 2407 bis 2603, das mittlere Subfragment-30 mit 184 Nukleotiden die Sequenz von 2558 bis 2741 und das letzte Subfragment-32 mit 199 Nukleotiden die Sequenz von 2724 bis 2922 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1* (Abb. 42). Ergänzend wurden das erste und das zweite Subfragment, sowie das zweite und das dritte Subfragment in den Subfragmenten-29 und -31 fusioniert.

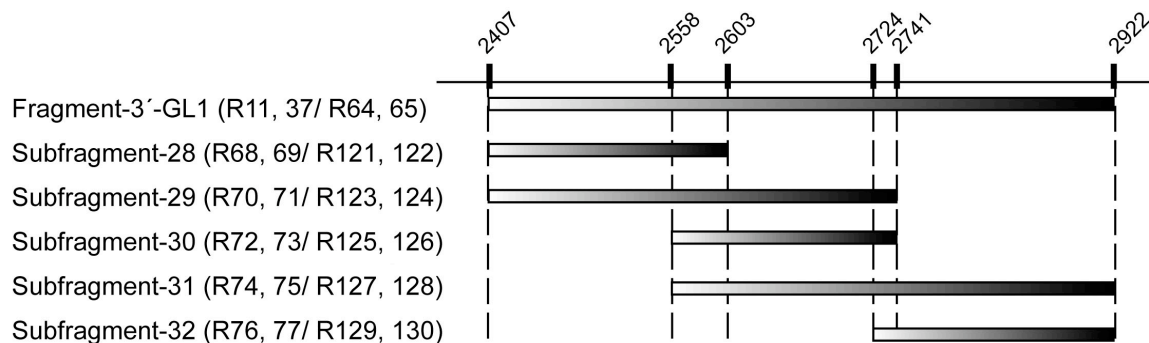


Abbildung 42: Überlappende Fragmente des 3'-Enhancers von *GL1*

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Subfragmente-28 bis -32 des 3'-Enhancers des *GLABRA1* Gens im Vergleich zum gesamten 3'-Enhancer. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*. In Klammern stehen die jeweiligen GUS- bzw. Rettungskonstrukte, in denen sich die Subfragmente befinden.

Zur Identifikation der informativen Bereiche des 3'-Enhancers, wurde das GUS-Gen unter die regulatorische Kontrolle des jeweiligen 3'-Enhancer-Subfragments (R69, R71, R73, R75 und R77) bzw. in Kombination mit dem 5'-Promotor Pr9 (R68, R70, R72, R74 und R76) gestellt (Abb. 43).

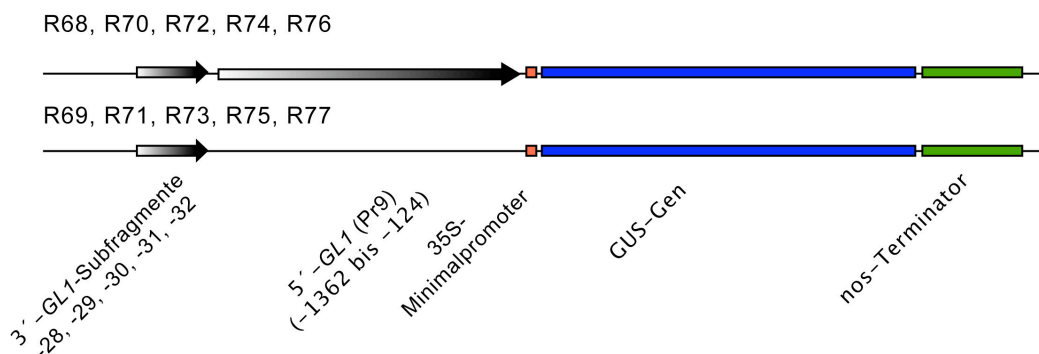


Abbildung 43: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R68 bis R77

Fusionen der regulatorischen Bereiche der 3'-Enhancer-Subfragmente und des 5'-Promotors von *GL1* in den GUS-Konstrukten R68 bis R77. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Für das vordere Subfragment-28 allein (Abb. 44C, D) war die Expression in den Pflanzen R69 ubiquitär in den jungen Blättern und in den Trichomen zu finden, in älteren Blättern verschwand sie zunehmend in den Blättern und in den adulten Trichomen, blieb aber länger in alten Trichomen erhalten, als mit R5 (nur Pr9, vgl. Abb. 13B, C). Ein vergleichbares Muster fand man auch in den Pflanzen R68 (Subfragment-28+Pr9, Abb. 44A, B). Das 3'-Subfragment-28 konnte folglich die regulatorische Information des 5'-Promotors überdecken.

Die Pflanzen, die nur das mittlere Subfragment-30 des 3'-Enhancers (R73) tragen, zeigten sehr intensive GUS-Expression ubiquitär in den Blättern und in den Trichomen junger wie auch älterer Stadien (Abb. 44K, L). Ein vergleichbares Expressionsmuster fand man auch, wenn das mittlere Subfragment-30 mit dem vorderen oder hinteren Subfragmenten des 3'-Enhancers in den größeren Subfragmenten-29 (R71, Abb. 44G, H) und Subfragment-31 (R75, Abb. 44O, P) kombiniert wurde. Prinzipiell dominierte die Regulation der Expression durch die 3'-Subfragmente-29, -30 und -31 die des 5'-Promotors Pr9, da für die zusätzliche Kombination des 5'-Promotors zu den Subfragmenten-29, -30 und -31 (R70, Abb. 44E, F; R72, Abb. 44I, J; R74, Abb. 44 M, N) in jungen Blättern ähnliche Resultate festgestellt werden konnten.

Ein Unterschied konnte allerdings für die Subfragmente-29, -30 und -31 in älteren Blättern für die Konstrukte ohne 5'-Promotor (R71, R73, R75) im Gegensatz zu denen mit dem 5'-Promotor (R70, R72, R74) beobachtet werden: In R70 (Subfragment-29+Pr9, Abb. 44F) persistierte die Expression in älteren Blättern länger, während für die Pflanzen R72 (Subfragment-30+Pr9, Abb. 44J) und 74 (Subfragment-31+Pr9, Abb. 44N) die Expression ausgehend von der Spitze des adulten Blattes reduziert wurde. Eine positive Interaktion konnte also von dem Subfragment-29 mit dem 5'-Promotor und eine negative Interaktion der Subfragmente-30 bzw. -32 mit dem 5'-Promotor für ältere Blätter festgestellt werden.

Die Regulation der Expression des hinteren Subfragments-32 ohne den 5'-Promotor zeigte in den Pflanzen R77 nur Expression in jungen Trichomen von Phase 1-5 oder evtl. 6 der Trichomentwicklung (Abb. 44S, T). In Kombination mit dem 5'-Promotor war GUS-Expression der Pflanzen R76 (Abb. 44Q, R) ununterscheidbar von den Pflanzen R5 (nur Pr9, vgl. Abb. 13B, C). Damit wurde die regulatorische Information des Subfragments-32 von der des 5'-Promotors dominiert. Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass die Expression der Pflanzen R76 und 77 schwächer als die der anderen Konstrukte war, da für R76 in einem Siebtel der untersuchten Linien und für R77 in mehr als der Hälfte der untersuchten Linien gar keine GUS-Expression nachgewiesen werden konnte, während alle Linien mit den anderen Konstrukte R68-75 GUS-Expression aufwiesen.

Eine Zusammenfassung der GUS-Expressionsdaten der 3'-Enhancer-Subfragmente kann Abb. 45 entnommen werden.

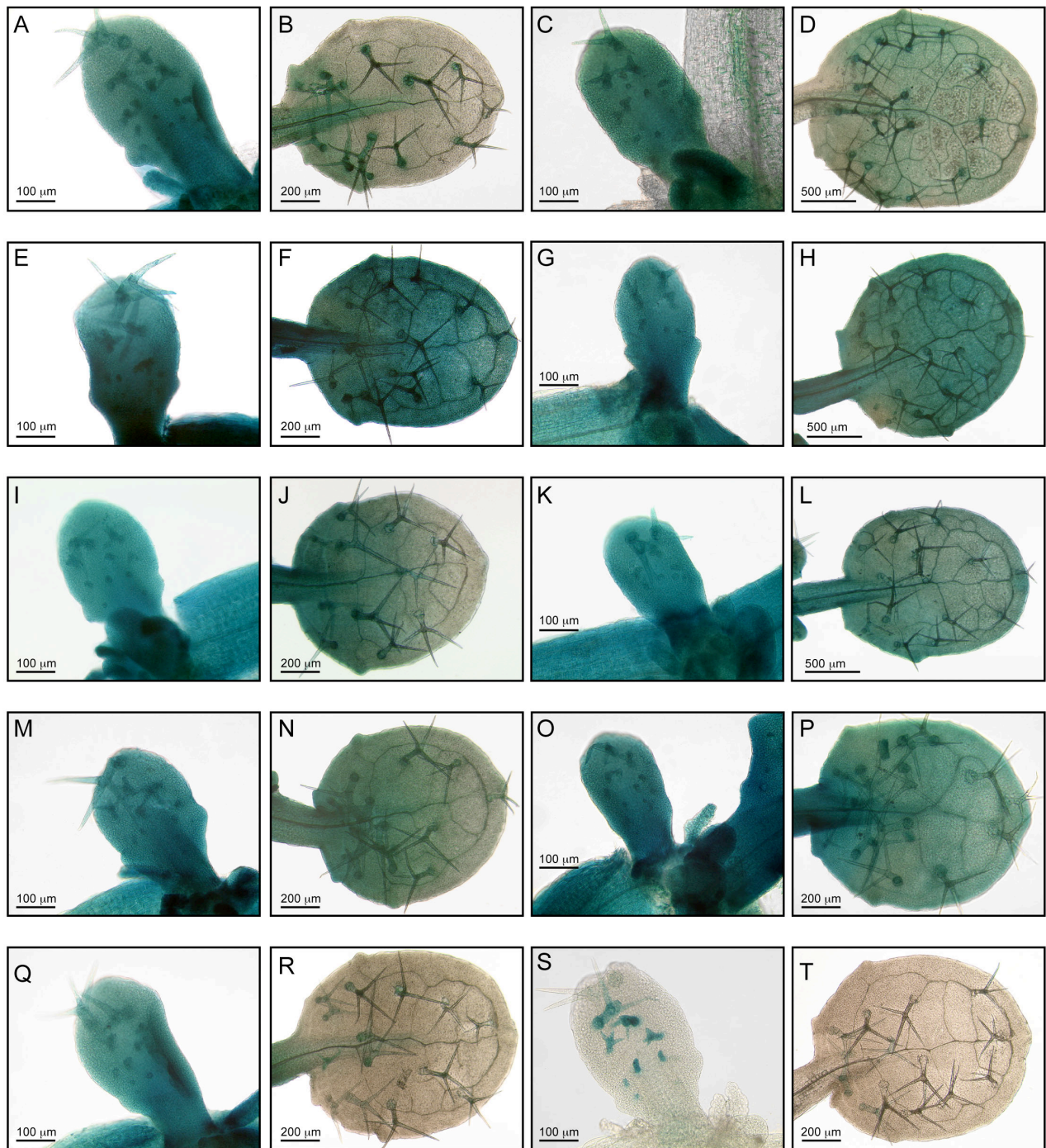


Abbildung 44: Expression der Konstrukte R68 bis R77 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 3'-Enhancer-Subfragmente-28 bis -32 in 5'-Position in *in Vivo*-Richtung in Kombination mit dem 5'-Promotor (Pr9) in den Konstrukten R68, 70, 72, 74 und 76 bzw. ohne den 5'-Promotor in den Konstrukten R69, 71, 73, 75 und 77 in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils zwei verschiedene Blattstadien dargestellt: R68 (A, B), R69 (C, D), R70 (E, F), R71 (G, H), R72 (I, J), R73 (K, L), R74 (M, N), R75 (O, P), R76 (Q, R) und R77 (S, T). In einer Zeile befinden sich zunächst die Dokumentationen der transgenen Pflanzen mit den Konstrukten, die das GUS-Gen unter die Kontrolle des 3'-Enhancer-Subfragments und des 5'-Promotors stellen, gefolgt von den entsprechenden Konstrukten bei denen die GUS-Expression nur durch das jeweilige 3'-Subfragment vermittelt wird.

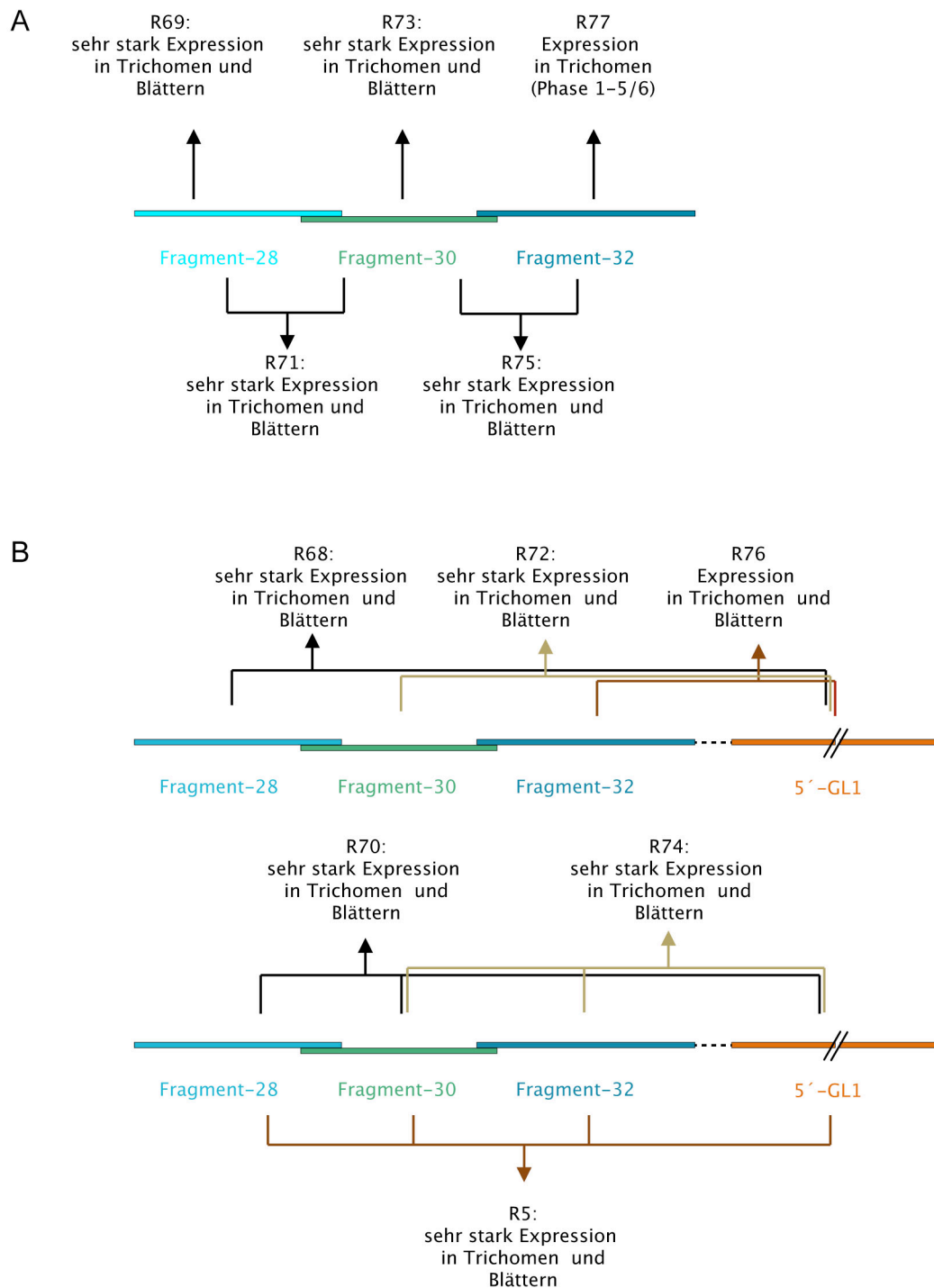


Abbildung 45: Zusammenfassung der Ergebnisse der 3'-Enhancersubfragmente ohne und mit 5'-Promotor von GL1 der GUS-Analyse

Dargestellt sind die Ergebnisse der GUS-Analyse, die sich für die 3'-Enhancersubfragmente ergaben. In A) ohne 5'-Promotor mit den Konstrukten R69, R71, R73, R75, R77 und B) mit 5'-Promotor mit den Konstrukten R68, R70, R72, R74 und R76.

In Ergänzung zu der Analyse der GUS-Expression wurde für die 3'-Subfragmente durch Austausch des GUS-Gens gegen die *GL1*-cDNA die Rettungseffizienz in der *gli* Mutante ermittelt. (Abb. 46).

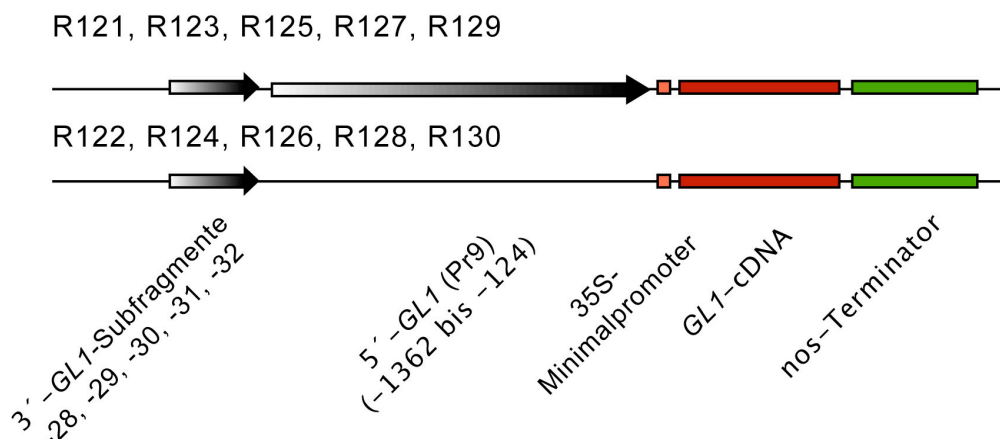


Abbildung 46: Schematische Darstellung der Rettungskonstrukte R121 bis R130

Fusionen der regulatorischen Bereiche 5'-Promotor und 3'-Enhancer-Subfragmente von *GL1* mit der *GL1*-cDNA der Konstrukte R121 bis R130 zur Rettungsanalyse. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Die Pflanzen R124 *gll(39F12)*, R126 *gll(39F12)* und R128 *gll(39F12)* (Abb. 47) zeigten Initiation von Trichomen: Für das Konstrukt R124 (nur Subfragment-29) war bei einer Vielzahl von T1-Pflanzen eine deutlich stärkere Rettungseffizienz nachweisbar als bei den beiden Konstrukten R126 (nur Subfragment-30) und R128 (nur Subfragment-31), die in ihrer Rettungskompetenz identisch waren. R124 konnte mit einer maximalen Trichomzahl von 7, 8, 19 und 24 auf Blatt 1-4 (Tab. 8) mit der des gesamten 3'-Enhancers von 6, 8, 15, und 20 (R65, vgl. Tab. 1) verglichen werden. Hingegen waren R126 und R128 mit 3, 4, 12, und 16 bzw. 2, 3, 12, 16 maximalen Trichomzahlen etwas schwächer in der Fähigkeit zur Trichombildung. Für die Pflanzen R122 *gll(39F12)* (nur Subfragment-28) und R130 *gll(39F12)* (nur Subfragment-32) war keine Rettung nachweisbar.

Die Kombinationen der einzelnen Subfragmente mit dem 5'-Promotor (Pr9) führte zu anderen Ergebnissen (Abb. 47). Die Pflanzen R121 *gll(39F12)* (Subfragment-28+Pr9) zeigten Rettung mit maximalen Trichomzahlen von 6, 7, 14 und 20 auf Blatt 1-4 (Tab. 8). Die Pflanzen R123 *gll(39F12)* (Subfragment-29+Pr9), R125 *gll(39F12)* (Subfragment-30+Pr9) und R127 *gll(39F12)* (Subfragment-31+Pr9) waren in ihrer Rettungseffizienz kaum zu unterscheiden und etwas schwächer als die Kombination des gesamten 3'-Enhancers mit dem 5'-Promotor Pr9 (R64, vgl. Abb. 17). Die maximalen Trichomzahlen auf Blatt 1-4 waren mit 6, 7, 20 und 30 für R123, mit 7, 7, 20 und 25 für R125 sowie mit 8, 10, 20 und 34 für R127 fast identisch. Sie erreichten jedoch nicht die Effizienz des 5'-Promotor mit dem kompletten 3'-Enhancer (R64 zeigte maximale Trichomzahlen von 9, 11, 24 und 31 auf Blatt 1-4 aufwies; s. Tab. 1), da die maximalen Trichomzahlen auf den ersten drei Blättern immer geringer waren.

Die Pflanzen R129 *gll(39F12)* (Subfragment-32+Pr9) bildeten keine Trichome aus.

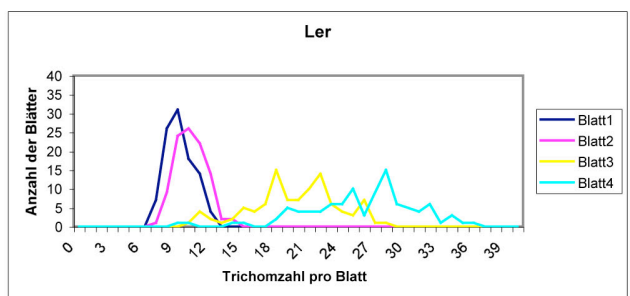
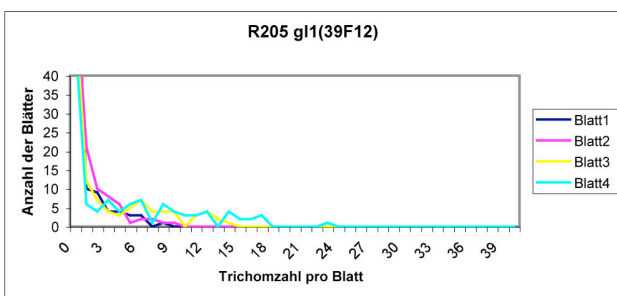
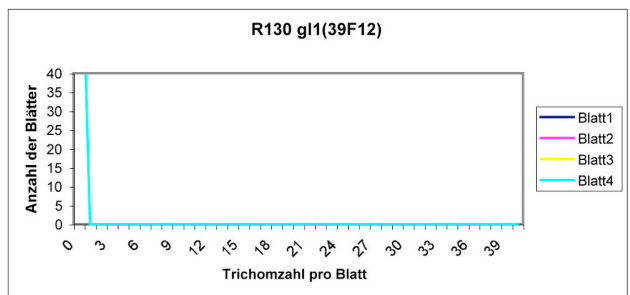
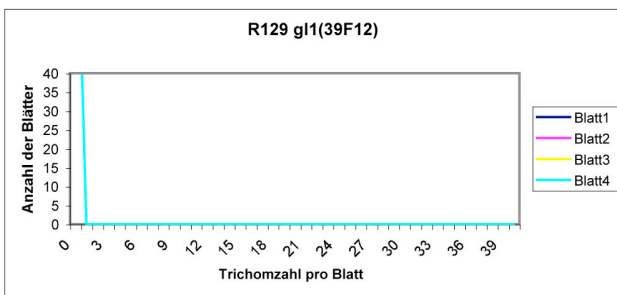
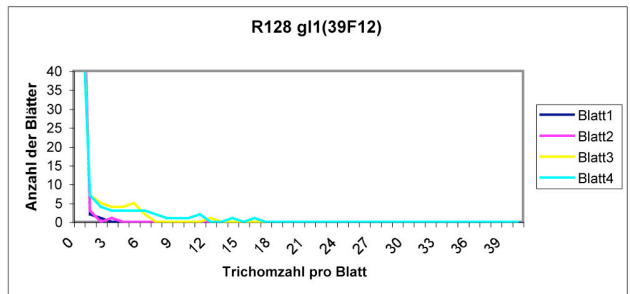
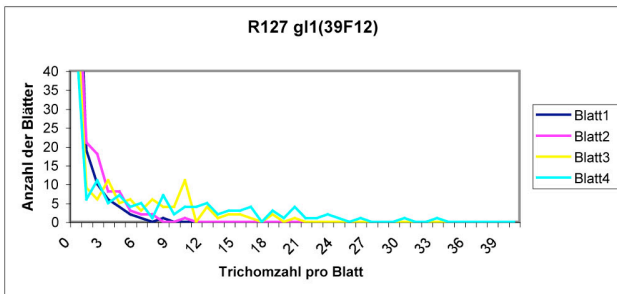
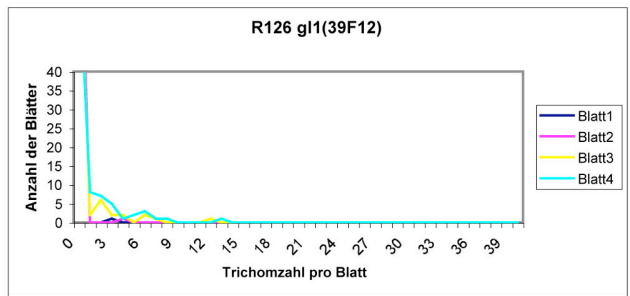
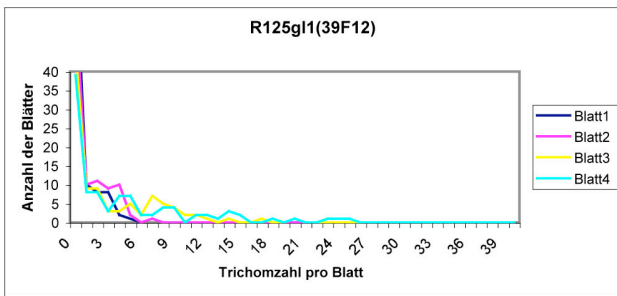
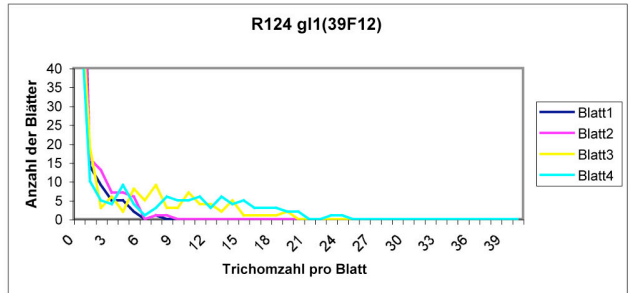
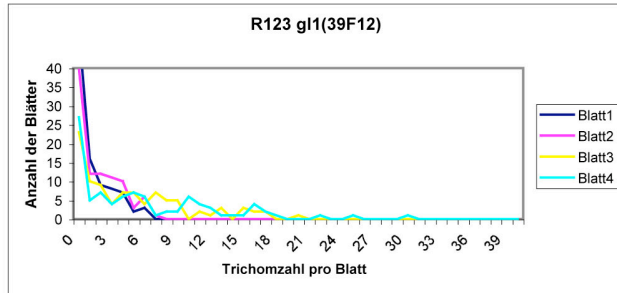
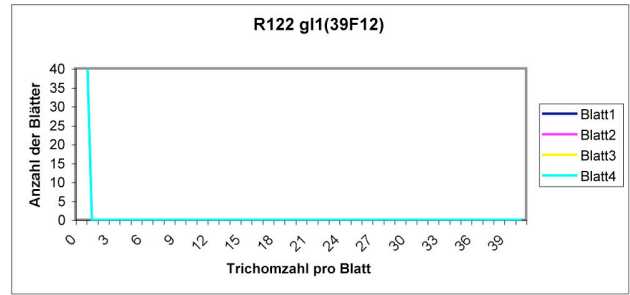
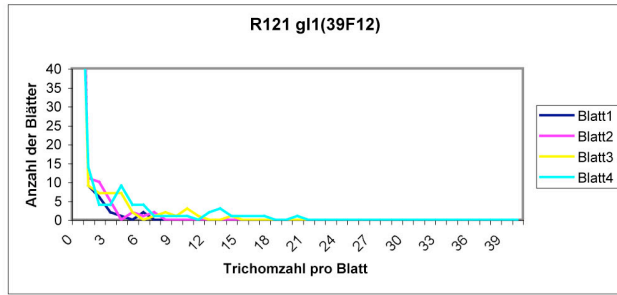


Abbildung 47: Rettungseffizienz der transgenen *g1* Pflanzen mit den Konstrukten R121 bis R130 und R205

Darstellung der Rettungseffizienz der *GL1*-cDNA der 3'-Enhancer-Subfragmente-28 bis -32 in 5'-Position in *in vivo*-Richtung in Kombination mit dem 5'-Promotor (Pr9) in den Konstrukten R121, 123, 125, 127 und 129, und ohne den 5'-Promotor in den Konstrukten R122, 124, 126, 128 und 130 in *g1(39F12)* Hintergrund. Außerdem ist das 3'-Enhancersubfragment-30 in Kombination mit dem 5'-Subfragment Pr1 in dem Konstrukt R205 dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1, 2, 3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation (R121-130 n= 160, 100, 95, 153, 101, 97, 140, 108, 60, 60 und 116).

Tabelle 8: Maximale Trichomzahlen der transgenen *g1* Pflanzen mit den Konstrukten R121 bis R130 und R205 auf den ersten, vier Rosettenblättern

Konstrukte	Promotorfragmente	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
R121 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-28 + Pr9	6	7	14	20
R122 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-28	0	0	0	0
R123 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-29 + Pr9	6	7	20	30
R124 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-29	7	8	19	24
R125 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-30 + Pr9	7	7	20	25
R126 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-30	3	4	12	13
R127 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-31 + Pr9	8	10	20	34
R128 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-31	2	3	19	24
R129 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-32 + Pr9	0	0	0	0
R130 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-32	0	0	0	0
R205 <i>g1(39F12)</i>	Subfragment-30 + Pr1	8	9	14	23

Zur Überprüfung der Interaktivität der einzelnen 5'-Promotor-Subfragmente mit den 3'-Enhancer-Subfragmenten wurde zusätzlich die Kombination des mittleren 3'-Enhancer-Subfragments-30 mit dem distalen 5'-Promotor-Subfragment Pr1 in dem Konstrukt R205 in seiner Rettungseffizienz getestet, da Pr1 und das Subfragment-30 sich jeweils durch die stärksten Rettungseffizienzen der kleineren Fragmente bei den vorherigen Analysen charakterisieren ließen (R60 vgl. Abb. 33, Abb. 47 und Tab. 5, Tab. 8). Dabei zeigte sich auch hier (Abb. 47, Tab. 8), dass die Kombination beider regulatorischer Bereiche eine sehr viel höhere Kompetenz zur Trichombildung vermittelte, als jeder einzelne. Das Subfragment Pr1 alleine produzierte in den Pflanzen R160 keine Trichome (vgl. Tab. 5) und das isolierte 3'-Enhancersubfragment-30 in R126 führte zu einer gemäßigten Rettung. R205 hingegen vermittelte die gleiche Verteilung der Trichomzahlen über die Gesamtheit der T1-Pflanzen über die ersten vier Rosettenblätter, die die Kombination von Subfragment-30 mit dem gesamten 5'-Promotor (R125) lieferte. Damit ist die Rettung für R205 gegenüber R126 deutlich zu höheren Werten verschoben.

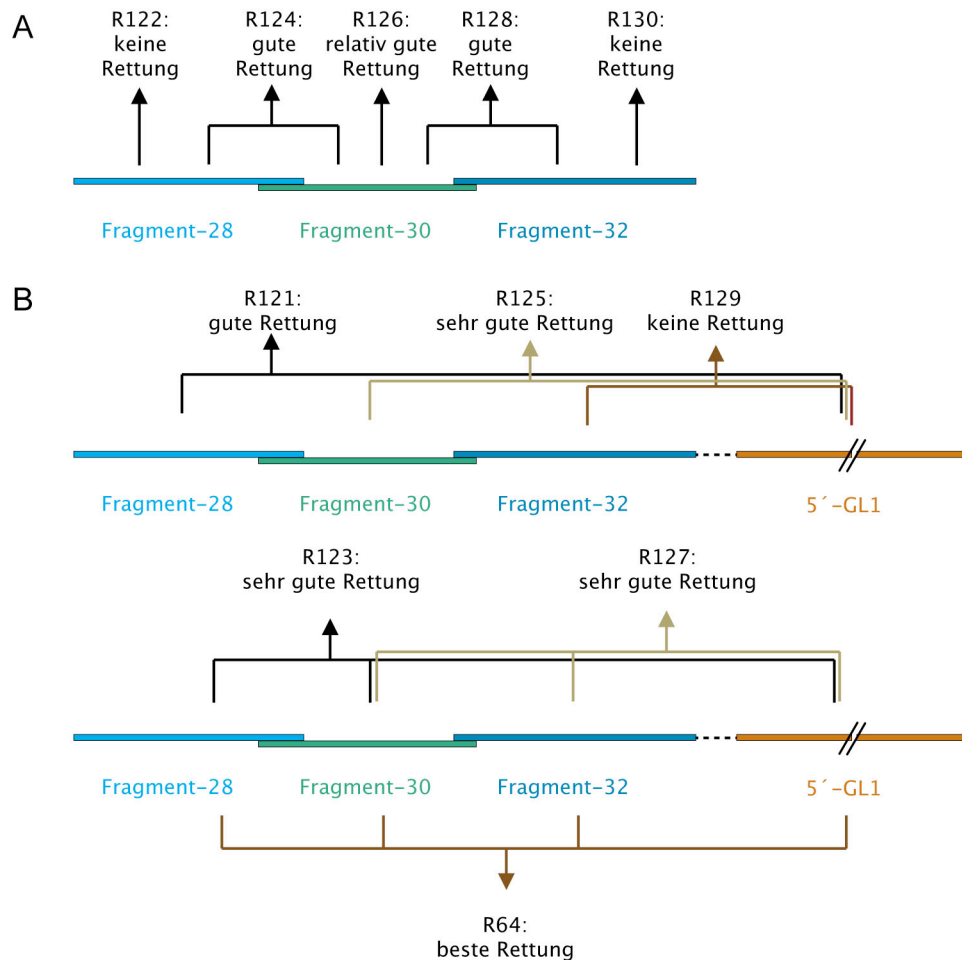


Abbildung 48: Zusammenfassung der Ergebnisse der 3'-Enhancersubfragmente ohne und mit 5'-Promotor von *GL1* der Rettungsanalyse

Dargestellt sind die Ergebnisse der Rettungsanalyse, die sich für die 3'-Enhancersubfragmente ergaben. In A) ohne 5'-Promotor mit den Konstrukten R122, R124, R126, R128, R130 und B) mit 5'-Promotor mit den Konstrukten R121, R123, R125, R127, R129.

Die Ergebnisse der Rettungsanalysen wurden in Abb. 48 zusammengefasst. Die Aufstellung eines Gradienten, der sich auf die Verteilung der Trichomzahlen auf den Rosettenblättern 1-4 bezieht, zeigte, dass die Kombination verschiedener regulatorischer Bereiche sich unterschiedlich auf die Trichominitiation auswirkte, woraus geschlossen werden konnte, dass die einzelnen Fragmente miteinander interagieren können:

R122 (Subf.-28), **R129** (Subf.-32+Pr9), **R130** (Subf.-32+Pr9), **R66** (Pr9), **R160** (Pr1)
 < **R126** (Subf.-30), **R128** (Subf.-31)
 < **R121**(Subf.-28+Pr9), **R124** (Subf.-29)
 < **R65** (3'-Enhancer)
 < **R205** (Subf.-30+Pr1), **R123** (Subf.-29+Pr9), **R125** (Subf.-30+Pr9), **R127** (Subf.-31+Pr9)
 < **R64** (3'-Enhancer+Pr9), **R60** (3'-Enhancer+Pr1)

Die zusammenhängende Betrachtung der Ergebnisse der GUS-Analyse und der Rettungsversuche ergab, dass das 3'-Enhancer-Subfragment-30 unter den kurzen Subfragmenten die entscheidende, regulatorische Information zur Musterbildung trägt. Aber auch die beiden kurzen Subfragmente-28 und -32 besitzen regulatorische Information, wobei das Subfragment-28 generell schwächere Blattexpression aufwies als Subfragment-30, und das Subfragment-32 nur noch in den jungen Trichomen GUS-Expression lieferte. Die Kombination des Subfragments-30 mit -28 in dem größeren Subfragment-29 führte zu einer Verstärkung. Die Kombination der Subfragmente-30 und -32 in dem Subfragment-31 zeigte keine Veränderung zum Subfragment-30. Da die Kombinationen der Subfragmente-29, -30 oder -31 mit dem 5'-Promotor nicht die Expressionsstärke des gesamten 3'-Enhancers mit 5'-Promotor erreichten, muss eine Bedeutung für alle Subfragmente bei der Trichominitiation vorliegen. Eine Einschätzung der Effizienz der einzelnen 3'-Enhancer-Subfragmente für die Trichom-Musterbildung und GUS-Expression ist im Folgenden dargestellt:

Subfragment -32 < -28 < -30, -31 < -29 < 3'-GL1.

Die Kombinationen des 5'-Promotors Pr9 als auch des 5'-Promotorfragments Pr1 lieferte also für die Subfragmente-28, 30 und 31 eine deutliche Verstärkung gegenüber den Einzelfragmenten. Wichtig ist aber zu beachten, dass auch die einzelnen Fragmente spezifische Information tragen und ihre Funktion nicht nur in einer quantitativen Verstärkung zu sehen ist.

2.3.11 Weitere Untersuchung der 3'-Enhancer-Subfragmente des GL1 Gens

Die identifizierten Subfragmente-28, 30 und 32 des 3'-Enhancers sollten durch weitere Deletionen eingegrenzt werden. Dabei wurden für jedes Subfragment die in Abb. 49 gezeigten Deletionen von beiden Enden der jeweiligen Sequenz durchgeführt. Für die Subfragmente-28 und -32 konnte mit einer 5'- oder 3'-Deletion keine GUS-Expression detektiert werden, weshalb die Enden dieser Fragmente von essentieller Bedeutung für die regulatorische Funktion sein müssen.

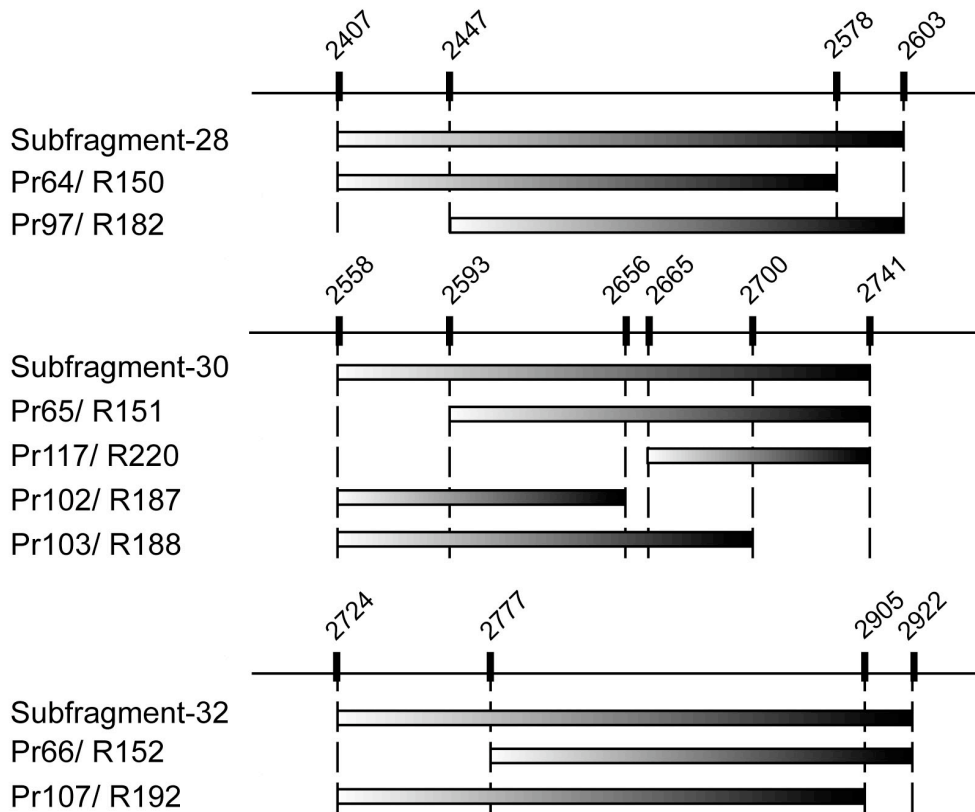


Abbildung 49: Deletionen der 3'-Enhancersubfragmente-28, -30 und -32 des *GL1*-Gens

Durch Schrägstrich getrennt sind die zugehörigen GUS-Konstrukte aufgelistet, in denen sich die Subfragmente befinden. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1*.

Für das Subfragment-30 konnte durch Deletion von 36 Nukleotiden (R151) ausgehend vom 5'-Ende die GUS-Expression verändert werden. Die Expression in den Trichomen war nur noch in den jungen Zellen schwach zu erkennen (Abb. 50A), und man fand sie hier nur in wenigen der untersuchten Linien. Die ubiquitäre Expression begrenzte sich in älteren Blättern auf den basalen Teil des Blattes (Abb. 50B), und auch in jungen Blättern konnte bereits das Verschwinden in der Spitzenregion beobachtet werden (Abb. 50A). Des Weiteren konnte man in den älteren Blättern und in den Petiolen ein gesprenkeltes Muster erkennen. Bei höherer Vergrößerung konnte man die einzelnen Punkte als Schließzellen des Spaltöffnungsapparats identifizieren (Abb. 50C). Eine weitere Deletion von 72 Nukleotiden (R220) führte zum Verlust der GUS-Expression.

Durch eine 42 Nukleotide lange Deletion vom 3'-Ende des Subfragments-30 (R188) konnte die ubiquitäre Blatt- und die Trichomexpression sehr stark geschwächt werden; gerade in jungen Blättern war sie nur noch zu errahnen (Abb. 50D-F). Eine weitere Deletion um 45 Nukleotide (R187) führt zu dem vollständigen Verlust der GUS-Expression.

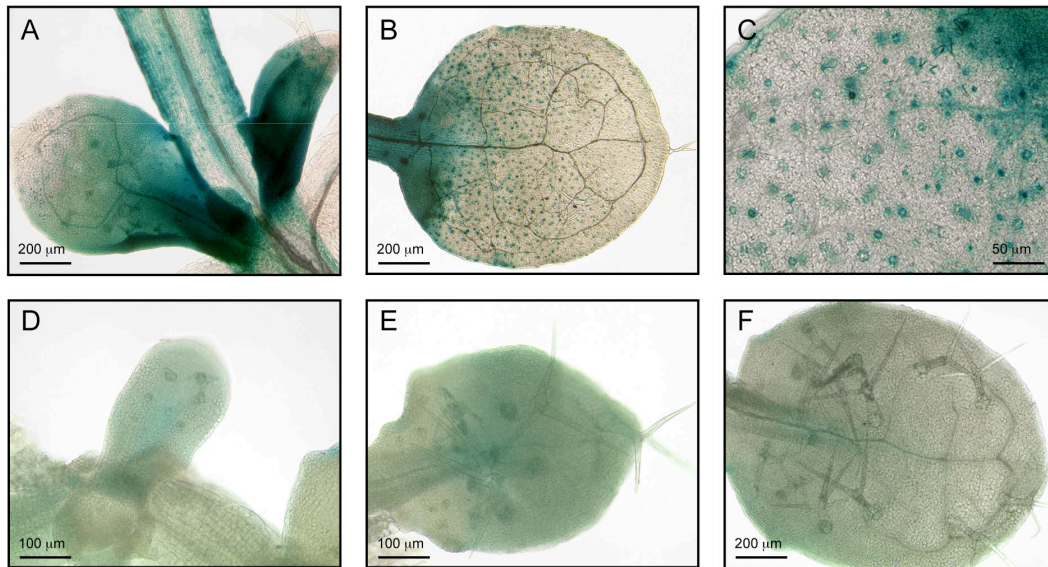


Abbildung 50: Expression der Konstrukte R151 und R188 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der Konstrukte R151 (A-C) und R188 (D-F), die Deletionen des 3'-Enhancer-Subfragments-30 in 5'-Position in *in Vivo*-Richtung beinhalten, in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. In A, B und D-F sind verschiedenen Blattstadien gezeigt. In C ist ein Ausschnitt aus B dargestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass in der 5'-Sequenz von Subfragment-30 inhibitorische, regulatorische Information für die Spaltöffnungen und positive Information für die Trichomspezifität positioniert ist, während in der 3'-Sequenz verstärkende, regulatorische Information lokalisiert sein muss (s. Abb. 51).

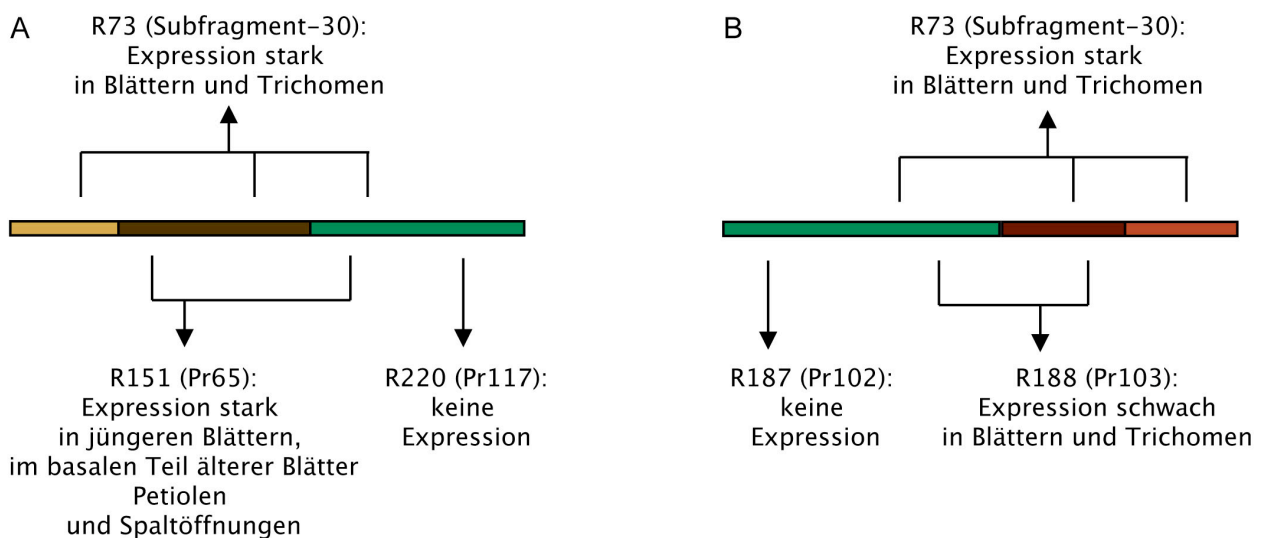


Abbildung 51: Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse der Deletionen des 3'-Enhancersubfragments-30 von GL1

In A) sind die Ergebnisse der GUS-Analysen der 5'-Deletionen in den Konstrukten R151 und R220 und in B) der 3'-Deletionen in den Konstrukten R187 und R188 dargestellt.

B

Nr.	Cis-Element	Sequenz	Bindender Faktor	Organismus	Gen/ Funktion
1	ABRELATERD1 ACGTABREMOTIFA2OSEN GADOWNAT	ACGTG ACGTGKC ACGTGTC	bZIP	Arabidopsis thaliana Oryza sativa, A. thaliana Arabidopsis thaliana	ERD1, Trockenstress und dunkelinduzierte Seneszenz OSEM, RD29A GA-Runterregulation (Gene des D1 Clusters)
2	ACGTABOX	TACGTA	bZIP	Oryza sativa	ERD1
3	ACGTATERD1	ACGT	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1
4	AMYBOX1	TAAACARA		Hordeum vulgare, Oryza sativa, Triticum aestivum	alpha-Amylase
5	ATHB1ATCONSENSUS	CAATWATTG		Arabidopsis thaliana	Dimerisierung
6	BOXIINTPATPB	ATAGAA	ATHB-1	Nicotiana tabacum	Plastidiäres ATPB, plastidiäre NCII-Promotoren
7	CAREOSREP1	CAACTC		Oryza sativa	GA-Hochregulation
8	CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG	AGL15 (MADS-BOX-TF)	Arabidopsis thaliana	
9	CATATGGMASUR	CATATG		Glycine max	SAUR15A, Auxin-Antwort
10	CCAIATLHCB1	AANAATCT	CCA1 (MYB)	Arabidopsis thaliana	Lhcb1*3
11	CGACGOSAMY3	CGACG		Oryza sativa	AMY3
12	DPBFCoreDCDC3	ACACNG	bZIP: DPBF1,2 ABI5	Daucus carota Arabidopsis thaliana	DC3
13	GAREAT, MYBGAHV	TAACAAR TAACAAA	GalMYB	Arabidopsis thaliana Hordeum vulgare	GA responsive Gene High pT alpha-Amylase
14	GT1CONSENSUS	GRWAAW	GT1-BF	Pisum sativum Avena sativa Oryza sativa	Licht-Regulation, SA-Induktion
				Nicotiana tabacum	
				Arabidopsis thaliana	
				Spinacia oleracea	
15	MYBIAT	WAACCA	MYB	Arabidopsis thaliana	z.B. AtRD22
16	MYCATERD1	CATGTG	NAC	Arabidopsis thaliana	Dehydratisierung
	MYCATRD22	CACATG	MYCATRD22	Arabidopsis thaliana	ABA-Induktion
17	MYCCONSENSUSAT	CANNTG	ATMYC2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA-Signaltransduktion
	EBOXNAP	CANNTG		Brassica napus	napA
18	NAPINMOTIFB	TACACAT		Brassica napus	Napin
19	PREATPRODH	ACTCAT		Arabidopsis thaliana	ProDH, Prolin- oder Hypoosmolarität-Antwort
20	PROLAMINBOXOSGLUB1	TGCAAAAG		Oryza sativa	GLUB1
21	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTCC		Hordeum vulgare	EPB-1, GA-Induktion
22	RAV1AAT	CAACA	RAV1	Arabidopsis thaliana	Element RAV1A in Kombination mit RAV1B In Rosettenblättern und Wurzel
23	TBOXATGAPB	ACTTTG		Arabidopsis thaliana	GAPB (-94 bis -89, und -84 bis -79)

24	W-BOX	(T)(T)TGACY	WRKY	Arabidopsis thaliana Nicotiana tabacum Oryza sativa	NPR1 (+70 und +79), SA-Induktion ERF3, Verwundung Amy32b, GA-Signaltransduktion
	WBOXATNPR1	TTGAC	WRKY		
	WBOXNTERF3	TGACY	WRKY		
	WRKY71OS	TGAC	WRKY71		

Abbildung 52: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 3'-Enhancers von GL1

In A ist die gesamte Sequenz des 3'-Enhancer von 2407 bis 2922 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *GLABRA1* dargestellt. Die Nummern in **rot** geben die Zuweisung zu den in B aufgeführten cis-regulatorischen Elementen an. Sie befinden sich über den entsprechenden **rot** unterlegten Nukleotiden, die das jeweilige Element charakterisieren. Die gebogenen Pfeile kennzeichnen den Anfang bzw. das Ende der 3'-Enhancer-Subfragmente, die jeweils daneben zu finden sind: **Subfragment-28, Pr64, Pr97, Subfragment-30, Pr102, Pr103, Pr65, Pr117, Subfragment-32, Pr66 und Pr107**.

In B sind die cis-regulatorischen Elemente mit zugehöriger Nukleotidsequenz, den bindenden Transkriptionsfaktoren (sofern bekannt), den Organismen, in den sie untersucht wurden, sowie das Gen, die Funktion bzw. der Stoffwechselweg, in dem sie identifiziert wurden, aufgelistet. Alle unwahrscheinlichen Elemente, wie z.B. PolyA-Signale, Pollen sowie *Agrobacterium* spezifischen Elemente, TATA- und CAAT-Boxen wurden nicht in die Liste aufgenommen. Außerdem wurden die Bindungsstellen, die nur durch 4 Nukleotide gekennzeichnet sind (DOFCORE, ARR1AAT, CACTFTPPCA1, GATA-Box), aufgrund ihrer Vielzahl außer Acht gelassen.

2.3.13 Vergleich der unterschiedlichen Module der regulatorischen Regionen von GL1

Die gemeinsame Betrachtung der regulatorischen Bereiche des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers ergab, dass insgesamt fünf unterschiedliche Module für die spezifische Regulation der Expression in Blättern und Trichom existieren (zwei im 5'-Promotor und drei im 3'-Enhancer). Daraus ergibt sich natürlich die Frage, ob diese Sequenzbereiche untereinander Homologien aufweisen. Der Versuch, die Sequenzen in Form eines Alignments miteinander zu vergleichen führte jedoch zu dem Ergebnis, dass sie aufgrund ihrer Unterschiedlichkeit nicht in Deckung zu bringen waren. Die Suche nach gemeinsamen Motiven mittels MEME-Analyse (Multiple Em for Motif Elicitation, <http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) ermöglichte ebenfalls keine Identifizierung langer, vergleichbarer Sequenzabschnitte.

Aus diesem Grund wurde eine Gegenüberstellung der einzelnen cis-regulatorischen Elemente der 5'-Fragmente Pr1, Pr5 und der 3'-Enhancerbereiche Fragment-28, Fragment-30 und Fragment-32 vorgenommen. Die einzelnen Elemente wurden in Kategorien unterteilt, die beschreiben, ob ein Element in zwei, drei, vier oder fünf Fragmenten vorhanden ist, so dass das Auftreten gleicher Elemente eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit der Kombinatorik der bindenden Transkriptionsfaktoren liefern könnte (Tab. 9). Einige Elemente konnten in mehreren Fragmenten vorgefunden werden, während andere nur in einem Fragment lokalisiert werden konnten.

Verbindungen konnten zu einer Regulation über die Phytohormone Abscisinsäure (ABA), Gibberellinsäure (GA), Jasmonat, Salicylsäure (SA) und Auxin festgestellt werden. Aber auch Elemente im Zusammenhang mit Abwehr, Hypoosmolarität, und Niedrigtemperatur, sowie circadianer Expression wurden ersichtlich.

Tabelle 9: Vergleich und Anzahl der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen regulatorischen Fragmenten von *GL1*

Für jedes cis-regulatorische Element ist aufgelistet, wie oft es in dem jeweiligen Fragment vorkommt. Die cis-Elemente sind funktionalen Kategorien zugeordnet, soweit dies möglich ist. Die Farbkodierung der Zellen spiegelt wider, in wie vielen der fünf Fragmente ein spezifisches Element auftritt (fünf, vier, drei, zwei). Die Zahl in den Klammern entspricht der cis-Elementnummer in Abb. 52.

Funktionale Kategorie	Cis-Element	Pr1	Pr5	Fragment-28	Fragment-30	Fragment-32
Expression		Trichome (Phase 1-6) und Blatt	Trichome (Phase 3-6) und Blatt	Trichome und Blatt	Trichome und Blatt	Trichome (Phase 1-5/6)
ABA	ABRELATERD1	-	1	1	1	-
ABA	ACGTATERD1	1	4	2	2	1
ABA	DPBFCOREDCDC3	-	-	-	1	-
ABA	MYB1AT	1	2	-	3	-
ABA	MYB2CONSENSUSAT	1	2	-	-	-
ABA	MYCATERD1/ MYCATRD22	-	-	-	1	-
Abwehr	MYB1EPR	1	-	-	-	-
Abwehr	SEBFCONSSTPR10A	1	-	-	-	-
Abwehr	SP8BFIBSP8BIB	2	-	-	-	-
Abwehr	W-BOX	-	1	2	1	1
Auxin	ARFAT	2	-	-	-	-
Auxin	CATATGGMSAUR	-	-	1	1	-
Circadian	CIACADIANLELHC	1	-	-	-	-
GA	AMYBOX1	-	1	-	-	1
GA	CAREOSREP1	-	-	-	1	-
GA	GARE2OSREP1	-	1	-	-	-
GA	GAREAT, MYBGAHV	1	1	-	-	1
GA	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	-	-	-	-	1
Hypoosmolarität	PREATPRODHD	1	-	-	-	1
Jasmonat	T/GBOXATPIN2	-	1	-	-	-
Licht	IBOX	-	2	-	-	-
Licht	TBOXATGAPB	2	-	-	1	-
Licht, SA	GT1CONSENSUS	3	3	-	-	3
Niedrigtemperatur	LTRE1HVBLT49	2	-	-	-	-
Phytochrom	REALPHALGLHCB21	1	1	-	-	-
Trockenstress	MYB2AT	1	1	-	-	-
	AACACOREOSGLUB1	-	1	-	-	-
	ACGTABOX	1	2	-	1	-
	ATHB1ATCONSENSUS	-	-	-	1	-
	BOXINTPATPB	1	2	-	-	1
	CARGCW8GAT	-	3	1	-	-
	CCA1ATLHCB1	-	-	-	1	-
	CGACGOSAMY3	-	-	1	-	-
	CONSERVED11NTZMATP1	-	1	-	-	-
	MYBCORE	3	2	-	-	-
	MYBST1	-	1	-	-	-
	MYCCONSSENSUSAT	1	2	1	2	-
	NAPINMOTIVBN	-	-	1	-	-
	PROLAMINBOXOSGLUB1	-	-	-	-	1
	QARBNEXTA	-	1	-	-	-
	RAV1AAT	1	-	2	-	1
	S1FBOXSORPS1L21	1	-	-	-	-

2.3.14 Einfluss von *GL1* auf die Transkription der regulatorischen Bereiche von *GL1*

Die ubiquitäre GUS-Expression der regulatorischen Bereiche des *GL1* Gens in den Blättern war auch in *gll* Hintergrund zu finden, d.h. sie ist unabhängig von dem eigenen Protein (Kirik *et al.*, 2005). Hier sollte untersucht werden, ob dies auch für den isolierten 3'-Enhancer und seine Subfragmente sowie für den 5'-Promotor zutrifft.

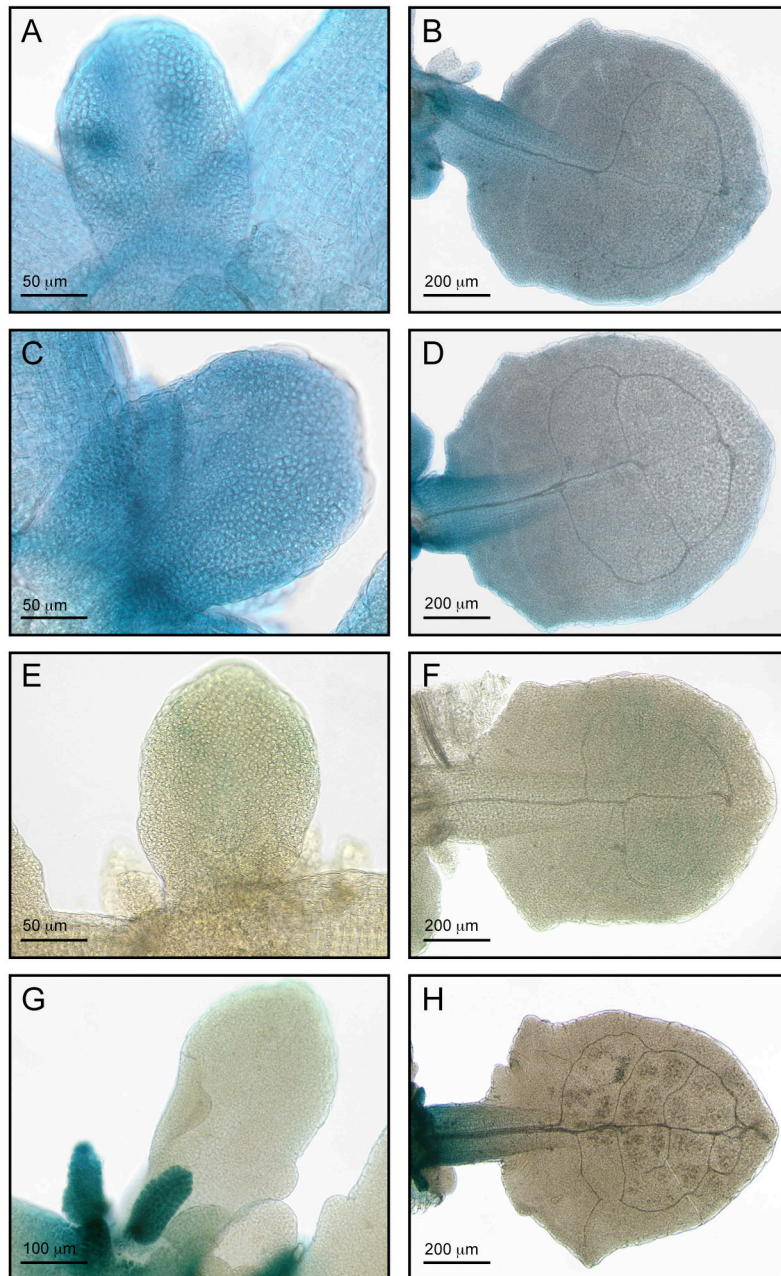


Abbildung 53: Expression der Konstrukte R37, R73, R69 und R5 in Rosettenblättern von *gll* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression in verschiedenen Blattstadien der Konstrukte mit 3'-Enhancer R37 (A, B), R73 (C, D), R69 (E, F) und mit 5'-Promotor R5 (G, H) in *gll* (39F12) Hintergrund nach 4 Stunden Färbung für R37 und R73 bzw. R69 und R5 nach 24 Stunden GUS-Färbung

Für den 3'-Enhancer war die GUS-Lokalisation des Konstruktes R37 in den zugehörigen transgenen *gll* (39F12) Pflanzen weiterhin ubiquitär in jungen Blättern zu sehen (Abb. 53A), und der bereits beschriebene basal-apikal abnehmende Expressionsgradient der älteren Blätter war zu erkennen (Abb. 53B). Dieselbe Lokalisierung fand sich auch in den transgenen *gll* Pflanzen, die

das Konstrukt R73 (Subfragment-30 des 3'-Enhancers) tragen (Abb. 53C, D). Das Konstrukt R69 mit dem vorderen 3'-Enhancersubfragment (Subfragment-28) wies in *gl1* Pflanzen im Gegensatz zum Wildtyp nur eine sehr schwache Expression in den Blättern auf (Abb. 53E, F), die kaum zu detektieren war. Für die *gl1* Pflanzen mit dem Konstrukt R77 mit dem hinteren 3'-Enhancersubfragment (Subfragment-32) war keine GUS-Expression nachweisbar (ohne Abb.). Der isolierte 5'-Promotor zeigte keine Expression sowohl in jungen als auch in alten Blättern. Nur die Expression in den Stipeln als auch an den Rändern der Petiolen blieb erhalten (Abb. 53G, H).

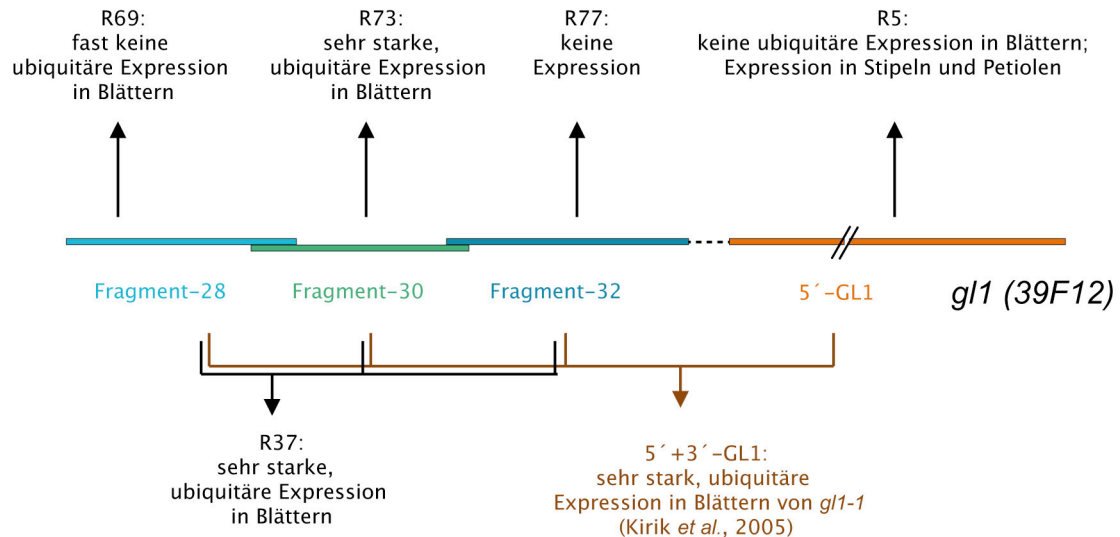


Abbildung 54: Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analysen von GL1 in der *gl1* Mutante

Dargestellt sind die Ergebnisse der GUS-Analyse in *gl1*(39F12) Mutanten, die sich für die Pflanzen R37, R5, R69, R73 und R77 ergaben, sowie zum Vergleich das Resultat des gesamten 5'-Promotors in Kombination mit dem 3'-Enhancers in *gl1-1* von Kirik *et al.* (2005).

Folglich wurde die Regulation der GUS-Expression (s. Abb. 54), die sowohl durch den 5'-Promotor als auch durch das vordere und das hintere Subfragment des 3'-Enhancers vermittelt wurde, durch GL1 aktiviert. Dadurch wird auch ersichtlich, dass GL1 für die ubiquitäre Blattexpression die durch den 5'-Promotor und das 3'-Subfragment-28 gesteuert wurde, verantwortlich war, während die Regulation der Expression durch den gesamten 3'-Enhancer und durch dessen mittleres Subfragment-30 unabhängig von dem Vorhandensein von GL1 war.

2.3.15 GA-abhängiges Transkriptionsmuster der regulatorischen Bereiche von GL1

Die Veröffentlichung von Perazza *et al.* (1998), demonstrierte, dass sowohl die Trichomininitiation als auch die *GLABRA1* Expression abhängig von Gibberellinsäure ist. Die eigene Identifikation einiger cis-Elemente im 5'-Promotor und im 3'-Enhancer, die im Zusammenhang mit der Gibberellinsäure-Regulation stehen, geben einen weiteren Hinweis dafür (vgl. Tab. 9). Zur Überprüfung der GA-Abhängigkeit des 5'-Promotors und/ oder des 3'-Enhancers wurden die transgenen pGGE4 Col-Samen (5'-Promotor + 3'-Sequenz inklusive 3'-Enhancer, von Larkin *et al.*,

1993), sowie die eigenen Samen R5 (Pr9), R1 (Pr1), R38 (3'-Enhancer-rev), R11 (3'-Enhancer-for + Pr9) und R16 (3'-Enhancer-rev + Pr9) in *Ler* Hintergrund auf MSAR-Platte ohne und mit 10^{-6} M Paclobutrazol, einem Inhibitor der GA-Biosynthese, angezogen und die GUS-Expression lokalisiert (Abb. 55).

Der Vergleich der Pflanzen ohne und mit Paclobutrazol zeigte, dass der Inhibitor der Gibberellinsäure-Biosynthese seine beschriebene Wirkung auf das Pflanzenwachstum ausübte, wie Zwergwuchs, kompakte Blätter und der Verlust der meisten Trichome zeigte (Sun und Gubler, 2004). Allerdings war die Anzahl bzw. der totale Verlust der Trichome auf den Paclobutrazol-MSAR-Platten nicht immer gleich. Dies ist möglicherweise auf eine Inhomogenität des Inhibitors, der erst nach dem Erstarren des Mediums aufpipettiert wurde und sich durch Diffusion verteilen musste, zurückzuführen.

Für das Konstrukt pGGE4 (Larkin *et al.*, 1993), das den 5'-Promotor und den 3'-Enhancer als regulatorische Bereiche besitzt, führte die Zugabe von Paclobutrazol zum Verlust der Expression in Blättern (Abb. 55A, B), während die stipuläre Expression erhalten blieb. Die wenigen zu identifizierenden Trichome zeigten eine schwache GUS-Färbung.

Die transgenen Pflanzen mit dem Konstrukt R5 mit dem 5'-Promotor Pr9 zeigten auf MS-Platte, wie bereits beschrieben, die Expression ubiquitär in jungen Blättern, in den Trichomen sowie in den Stipeln (Abb. 55C). Mit Paclobutrazol konnte GUS-Expression nur noch in den Stipeln lokalisiert werden (Abb. 55D). Die wenigen sichtbaren Trichome wiesen keine GUS-Färbung auf. In den transgenen Pflanzen mit dem Konstrukt R1, das den distalen Teil des 5'-Promotors Pr1 trägt, konnte ohne Paclobutrazol auf MS-Platte GUS-Expression nur in den jüngeren Trichomen und in den Petiolenrändern älterer Blätter detektiert werden (Abb. 55E). Mit Paclobutrazol ließ sich keine GUS-Färbung mehr nachweisen (Abb. 55F).

Der isolierte 3'-Enhancer der Konstrukte R38 (Abb. 55G) und R37 (ohne Abb.) vermittelte starke Expression in den Blättern und in den Trichomen, die auch in älteren Blättern zu sehen war. In den mit Paclobutrazol behandelten Pflanzen blieb diese starke Expression erhalten (Abb. 55H). Die Pflanzen R11 und R16, die den 3'-Enhancer in 5'-Position in Kombination mit dem 5'-Promotor Pr9 tragen, zeigten die gleiche Expression ohne Paclobutrazol (Abb. 55I, K). Die Zugabe von Paclobutrazol führte zu einer starken Reduktion der ubiquitären Blattexpression (Abb. 55J und L). In den Stipeln und in den jungen Blattprimordien blieb sie allerdings erhalten. Ebenso war die Expression in den Trichomen sehr gut zu sehen.

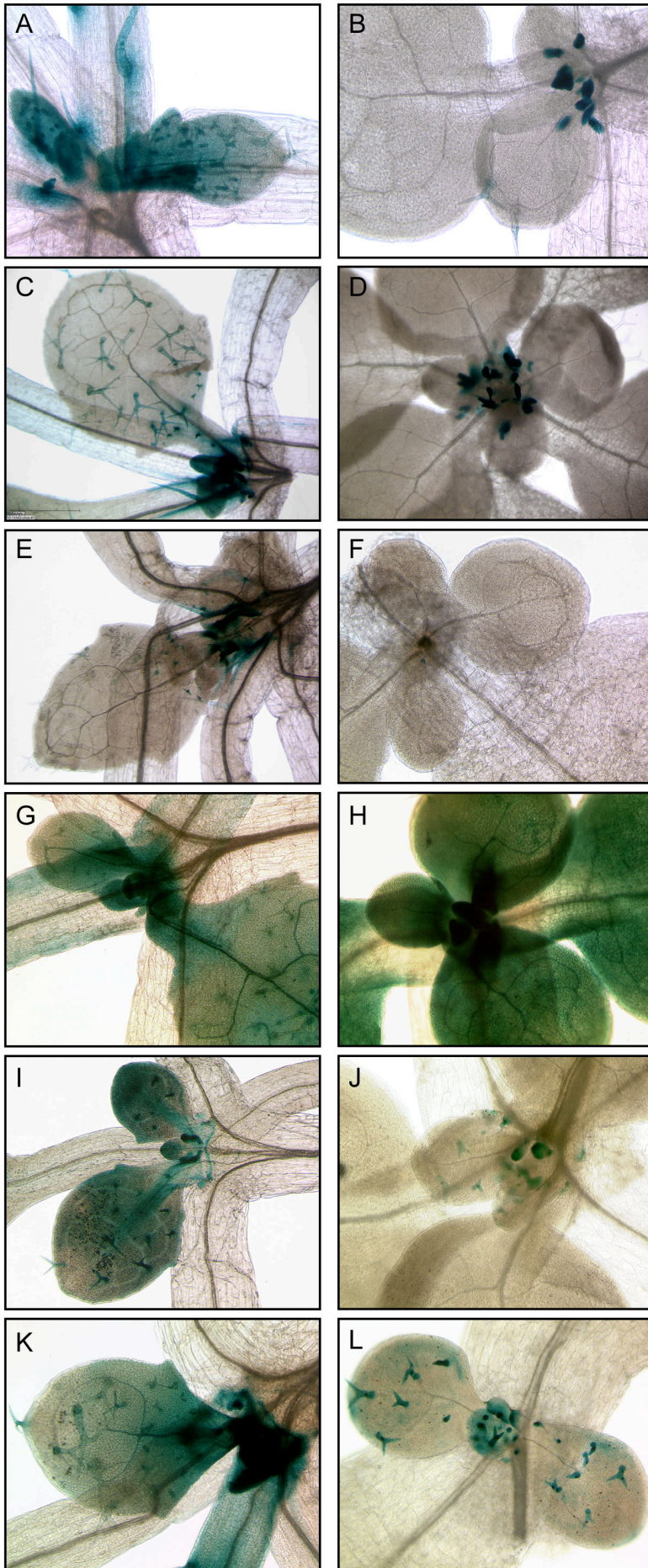


Abbildung 55: Expression der Konstrukte pGGE4, R5, R1, R38, R11 und R16 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen nach Wachstum auf Paclobutrazol

Lokalisierung der GUS-Expression der Konstrukte pGGE4 (A, B), R5 (C, D), R1 (E, F), R38 (G, H), R11 (I, J) und R16 (K, L) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. In A, C, E, G, I und K sind 18 Tage alte Pflanzen von MSAR-Platte ohne Paclobutrazol (ein GA-Biosynthese-Inhibitor) und in B, D, F, H, J und L die entsprechenden mit 10^{-6} M Paclobutrazol dargestellt.

Es wurde ersichtlich (vgl. Abb. 56), dass die GUS-Expression im Blatt, die durch den 5'-Promotor Pr9 vermittelt wurde, durch Paclobutrazol reduziert wurde. Die Abhängigkeit der transkriptionellen Regulation durch Gibberellinsäure war folglich in diesem Bereich lokalisiert. Die Regulation durch den 3'-Enhancer in 5'-Position war dagegen nicht sensitiv für den GA-Inhibitor. Durch Kombination des 3'-Enhancers mit dem 5'-Promotor war durch Paclobutrazol eine starke Reduktion der ubiquitären Blattexpression zu beobachten, wobei die restlichen Trichome nicht betroffen waren, d.h. der 5'-Promotor konnte die Regulation des starken 3'-Enhancers in diesem Gewebe bestimmen, während sich die Aktivierung der starken Transkription in den Trichomen durch den 3'-Enhancer weiterhin gegenüber dem 5'-Promotor durchsetzte.

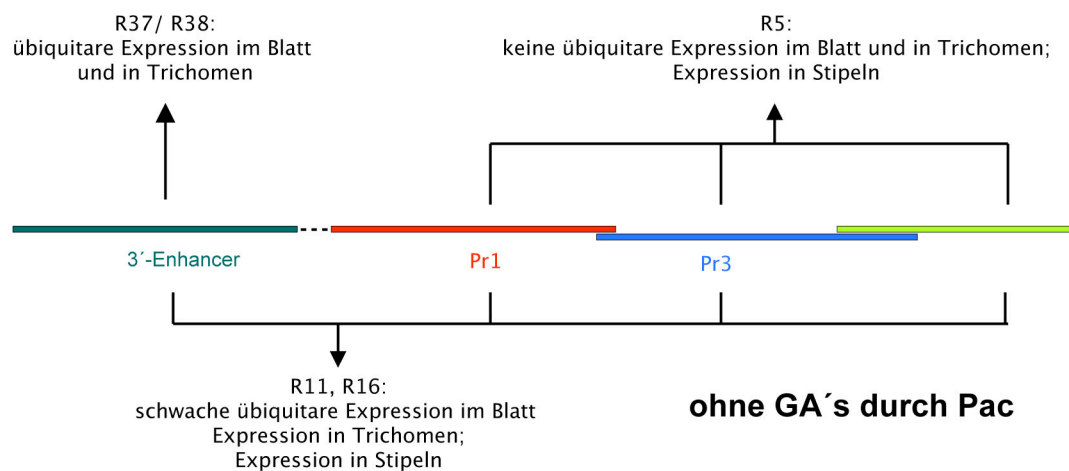


Abbildung 56: Ergebnisse der GUS-Analysen der GA-Abhängigkeit von GL1

Dargestellt sind die Ergebnisse der GUS-Analyse auf Paclobutrazol-Medium (Pac), das die GA-Synthese unterbindet, für die Pflanzen R37, R38, R5, R11 und R16.

2.3.16 Einfluss von *GeBP* auf die Regulation von *GL1*

Ein möglicher Faktor, der die Transkription von *GLABRA1* regulieren könnte, ist das Protein *GeBP* (*GLABRA1* Enhancer Binding Protein), das durch einen Hefe-Ein-Hybrid-System des mittleren Bereiches des 3'-Enhancers identifiziert wurde (Curaba *et al.*, 2003).

Der Einfluss der Überexpression von *GeBP* auf die Trichomininitiation sollte überprüft werden. Dazu wurden durch Kreuzung Pflanzen erzeugt, die gleichzeitig *GL1* und *GeBP* überexprimieren. 35S::*GL1* Pflanzen produzierten hauptsächlich Trichome am Rand der Blätter, während der Bereich der Mittelrippe trichomfrei blieb (Abb. 57A-C) (Larkin *et al.*, 1994; Oppenheimer *et al.*, 1991). Auch im heterozygoten Zustand war dieser Phänotyp weiterhin zu erkennen, wie die Kreuzung der 35S::*GL1* Pflanzen mit Col Pflanzen in der F1-Generation zeigte (Abb. 57D-F). Die Überexpression von *GeBP* ließ sich phänotypisch nicht vom zugehörigen Col Hintergrund unterscheiden, zeigte folglich eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Rosettenblatt (Abb.

57 G-I; Curaba *et al.*, 2003). Die Überexpression beider Proteine, GL1 und GeBP, änderte den 35S::GL1-Phänotyp nicht (Abb. 57J-L).

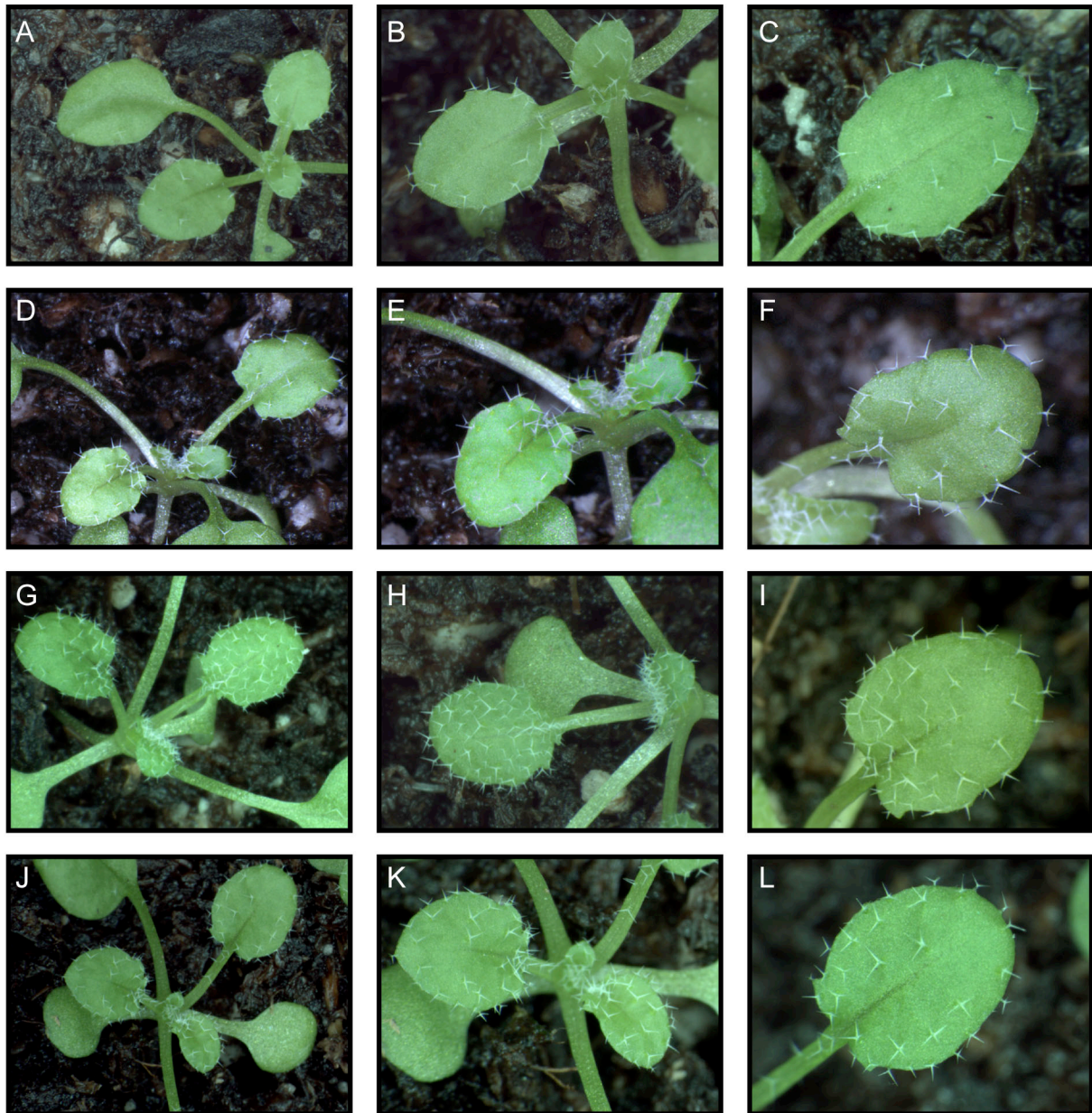


Abbildung 57: Blattrosette und einzelne Rosettenblätter der Pflanzen 35S::GL1, 35S::GeBP und ihrer Kreuzungen

Homozygoten 35S::GL1 Pflanzen (A-C), 35S::GL1 Pflanzen gekreuzt mit Col in der F1 (D-F), homozygoten 35S::GeBP Pflanzen (G-I) und 35S::GL1 35S::GeBP gekreuzten Pflanzen in der F1 (J-L).

Auf die Trichomanzahlen der ersten vier Rosettenblätter konnte ein schwacher Einfluss von 35S::GeBP festgestellt werden (Tab. 10). In den 35S::GL1 Pflanzen zeigte sich eine deutliche Reduktion der Trichomanzahl gegenüber dem zugehörigen Col Wildtyp. Diese Reduktion war auch in den heterozygoten 35S::GL1 Pflanzen sichtbar, jedoch waren mehr Trichome vorhanden als in den homozygoten Pflanzen. 35S::GeBP Pflanzen produzierten mehr Trichome als der Wildtyp Col,

und die heterozygoten 35S::GeBP-Pflanzen zeigten auf den ersten beiden Rosettenblättern geringfügig mehr Trichome, als die homozygoten Pflanzen. Die F1-Generation der Kreuzung 35S::GeBP mit 35S::GL1 zeigte eine Steigerung der Trichomzahl der heterozygoten 35S::GL1 Pflanzen, erreichte aber nicht die Anzahl des Wildtypes, da, wie in Abb. 57 gezeigt, der Bereich der Mittelrippe frei blieb. Die 35S::GeBP Überexpression war folglich in der Lage, die Trichominitiation geringfügig zu erhöhen. Sie konnte jedoch den 35S::GL1 Phänotyp nur partiell in der Anzahl, aber nicht in der Musterbildung retten. Die Salk-Linie GT6658, die den Funktionsverlust von GeBP trägt (Curaba *et al.*, 2003), führte zu keiner Änderung der Trichomzahlen und der Musterbildung (Tab. 10).

Tabelle 10: Trichomanzahlen der Pflanzen 35S::GeBP, 35S::GL1 und GT6658 und ihrer Kreuzungen (F1) auf den ersten vier Rosettenblättern (n=20)

	Blatt1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
35S::GL1	6,0 ± 1,2	7,4 ± 1,4	17,3 ± 1,8	22,8 ± 4,5
35S::GL1x Col (F1)	12,3 ± 1,7	14,6 ± 2,5	26,9 ± 3,0	29,8 ± 4,0
35S::GeBP	15,3 ± 2,0	17,2 ± 2,4	45,7 ± 5,9	62,5 ± 10,2
35S::GeBP x Col (F1)	18,3 ± 2,2	19,9 ± 2,0	46,3 ± 6,4	64,3 ± 7,4
35S::GeBP x 35S::GL1 (F1)	12,5 ± 1,4	13,2 ± 1,0	34,1 ± 4,1	43,0 ± 8,6
Col	13,3 ± 1,7	15,2 ± 2,2	36,4 ± 5,5	52,5 ± 10,2
GT6658 (Ler)	7,0±1,0	8,1±1,2	17,9±2,4	25,6±3,1
Ler	6,6±1,1	7,5±1,0	18,0±2,0	26,0±3,4

Die Überexpression von *GeBP* in transgenen Pflanzen, die das Konstrukt pGGE4 (pGL1::GUS, (Larkin *et al.*, 1993) tragen, verursachte geringe Variation gegenüber dem Wildtyp. Die Pflanzen wuchsen mit 35S::GeBP schneller als der Wildtyp, so dass die Blattstadien nicht identisch sind. In der 35S::GeBP überexprimierenden Linie sah man ektopische GUS-Expression in den Kotyledonen (Abb. 58B), die in Col Pflanzen nicht zu erkennen war (Abb. 58A). In älteren Rosettenblättern der 35S::GeBP Pflanzen erschien die Expression weniger stark (Abb. 58E-H). Die Expression in der Basis älterer Blätter (Abb. 58D) war im Gegensatz zum Col Hintergrund (Abb. 58C) nicht mehr zu erkennen.

Um zu überprüfen, ob das GeBP Protein in der Lage ist, die *GL1* Expression ektopisch zu induzieren, wurden Kotyledonen von pGGE4 Pflanzen, die grundsätzlich keine GUS-Färbung zeigten, mit dem 35S::GeBP und 35S::GFP Konstrukt durch Partikelbeschuss transient transformiert. Epidermiszellen der Kotyledonen, die zuvor aufgrund von GFP-Markierung transformiert identifiziert wurden, zeigte keine GUS-Expression (ohne Abb.). Sowohl der gleichzeitige Beschuss der Konstrukte 35S::GeBP mit 35S::GL1 und 35S::GFP als auch von 35S::GeBP mit 35S::GL1, 35S::GL3, 35S::TTG1 und 35S::GFP zeigte keine GUS-Expression der GFP markierten Epidermiszellen der pGGE4 Kotyledonen. Das GeBP-Protein war folglich weder

alleine noch in Kombination mit GL1 bzw. mit den Komponenten des Aktivatorkomplexes (*GL1*, *GL3*, *TTG1*) in der Lage, die *GL1*-Expression ektopisch zu induzieren, im Gegensatz zu der Expression in den Kotyledonen der stabil transformierten 35S::GeBP Pflanzen.

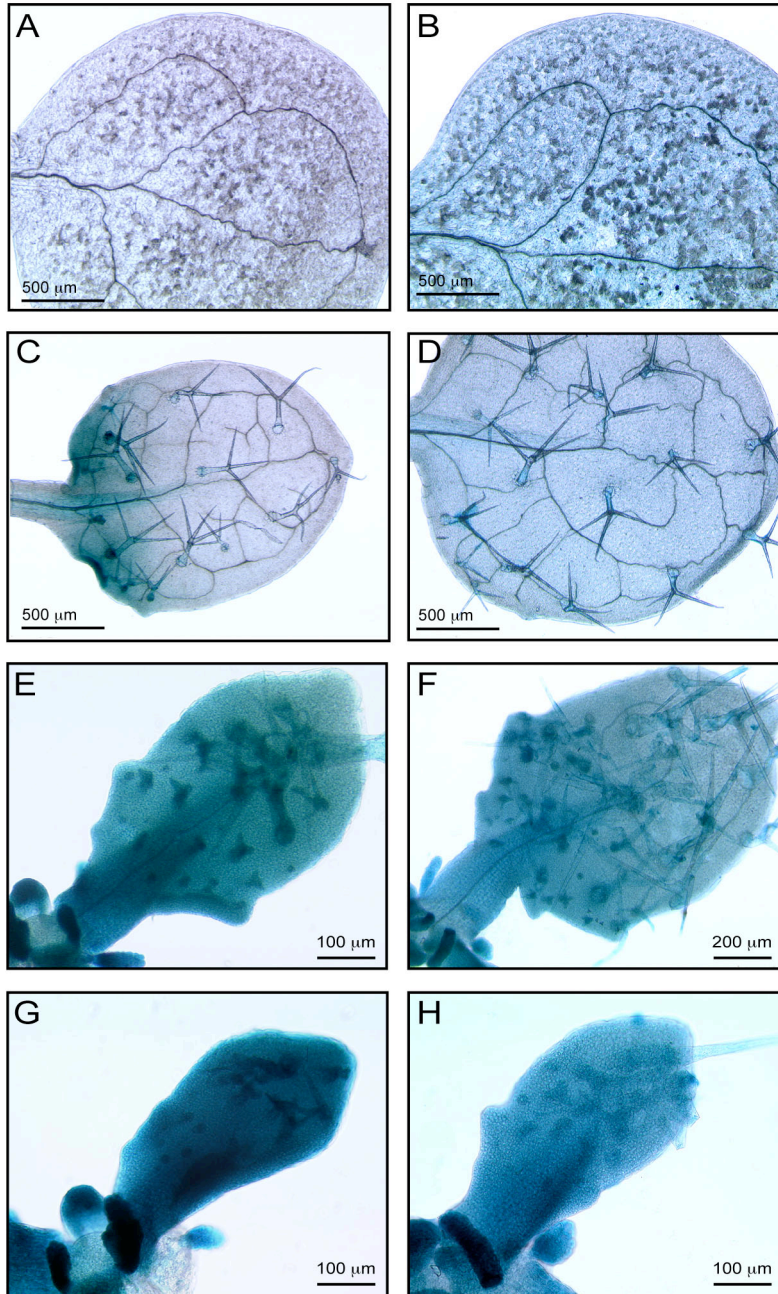


Abbildung 58: Expression des Konstruktes pGGE4 in Rosettenblättern von Ler und 35S::GeBP Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression in Kotyledonen und verschiedenen Blattstadien von pGGE4 (A, C, E, G) und pGGE4 35S::GeBP in der F1 (B, D, F, H) nach 24 Stunden GUS-Färbung.

2.3.17 Rettung des *gl1* Hintergrundes mit der *GL1*-cDNA unter der Regulation unterschiedlicher Promotoren

Um zu klären, ob regulatorische Sequenzen anderer Gene, die ein ähnliches Expressionsmuster wie *GL1* zeigen, die Funktion des *GL1*-Promotors übernehmen können, wurden verschiedene Promotoren vor den 35S-Minimalpromotor fusioniert, um die Expression der *GL1* cDNA zu vermitteln. Dazu wurden der *TRIPTYCHON*-Promotor in Volllänge und als Minimalfragment, der

CAPRICE-Promotor in Volllänge und als Minimalfragment (die Minimalfragmente wurden in den folgenden Kapiteln 2.5.2 und 2.6.1 identifiziert), sowie der *GL2*-Promotor (Szymanski, 1998) verwendet. Zusätzlich wurde auch der *AtML1* Promotor untersucht, der ein nah verwandtes Gen zu *GL2* darstellt (Sessions *et al.*, 1999), und mit dem Konstrukt pAtML1::GFP::GL1 in der Lage ist, *gll* zu retten (Esch *et al.*, 2003). Der Tab. 11 sind die jeweiligen Konstrukte zu entnehmen, die in die Funktionsverlustmutante *gll* (39F12) transformiert wurden.

Tabelle 11: Kombination der Promotorfragmente mit der *GL1*-cDNA in den zugehörigen Konstrukten zur Rettung der *gll* Mutante

Promotor	Fragment	Konstrukt
pTRY	Pr15 + Fragment33	R163
pTRY	Pr16 + Fragment33	R164
pTRY	Pr23 + Fragment33	R165
pTRY	Pr15	R166
pTRY	Pr16	R167
pTRY	Pr23	R168
pTRY	Fragment33	R171
pCPC	Pr17	R169
pCPC	Pr24	R170
pGL2	-2132 bis -28	pGL2::GL1
pATML1	-3622 bis -275	pATML1::GFP::GL1 (Esch <i>et al.</i> , 2003)

Die *gll* Pflanzen, die eines der Konstrukte R163 bis einschließlich R169 und R171 (s. Tab. 11) beinhalten, waren nicht in der Lage, Trichome auf den ersten vier Rosettenblättern auszubilden (Abb. 59). Das Konstrukt R170, das den gesamten *CPC*-Promotor trägt, konnte in den entsprechenden, transgenen Pflanzen wenige Trichome initiieren mit maximal einem Trichom auf den ersten beiden Rosettenblättern und 3 bis 4 Trichomen auf dem zweiten Blattpaar (Abb. 59, Tab. 12).

Die Rettung des *gll* Hintergrundes mit dem *GL2*-Promotor war über eine große Zahl von T1-Pflanzen und mit maximalen Trichomzahlen von 6, 10, 22 und 31 auf den Rosettenblättern 1-4 nahezu wildtypisch (Abb. 59, Tab. 12). Der *AtML1*-Promotor lieferte allerdings eine noch bessere Rettung, wie das Verteilungsmuster über die T1-Pflanzen klar machte. Die maximalen Trichomzahlen auf Blatt 1-4 betrugen 14, 14, 34 und 44 und entsprachen dem *Ler*-Wildtyp mit 14, 16, 36 und 46 Trichomen.

Damit sind Aktivator und Inhibitor nicht austauschbar, womit die trichomspezifische Expression alleine nicht ausreichend ist, um Musterbildung mit der *GL1* cDNA zu ermöglichen. Hingegen können *GL2* und *AtML1* das korrekte Expressionsmuster für die Musterbildung zu liefern, obwohl *AtML1* gar nicht in die Trichom-Musterbildung involviert ist, und *GL2* keinen Hauptregulator der Musterbildung darstellt, sondern in bestimmten Aspekten selbst durch den Aktivator-Komplex reguliert wird (Szymanski *et al.*, 1998a).

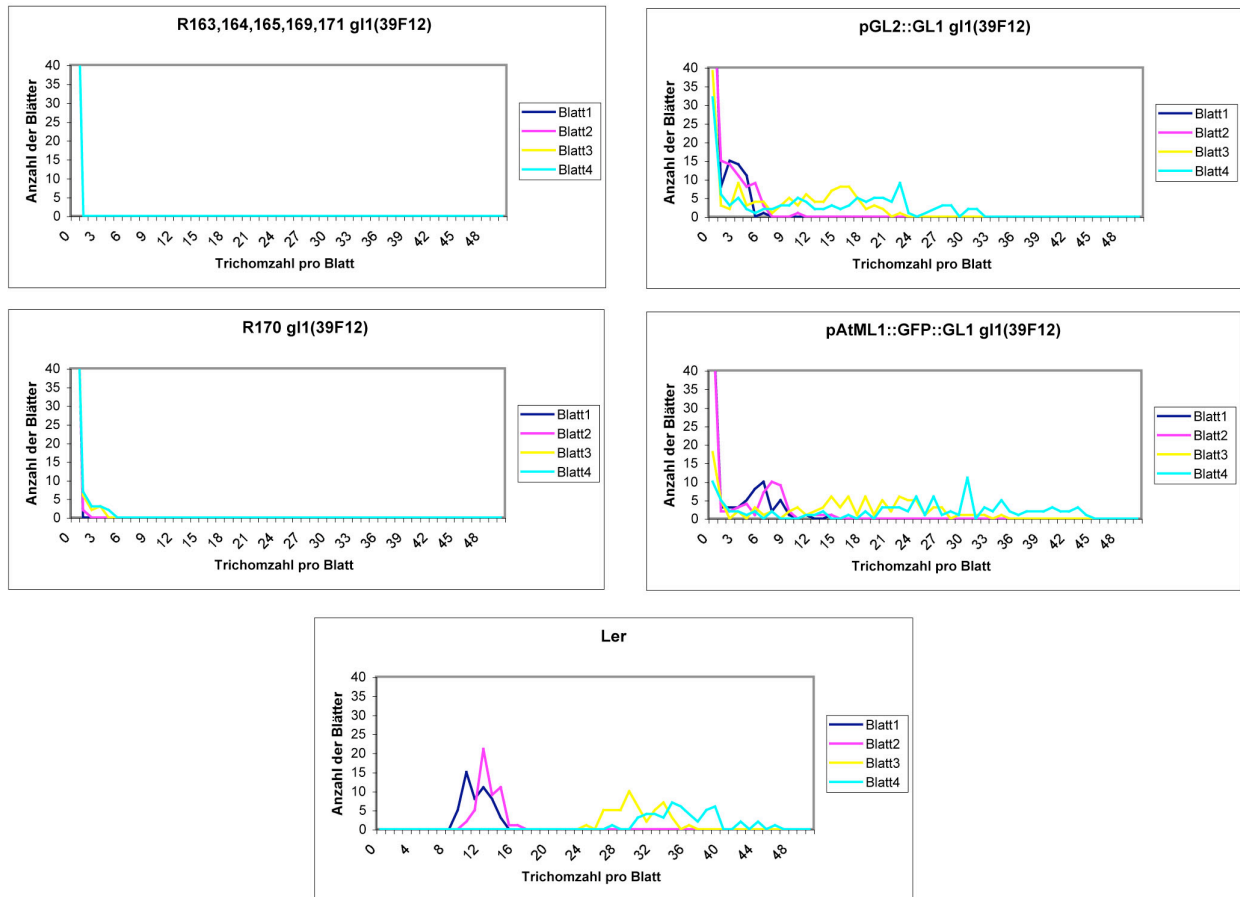


Abbildung 59: Rettungseffizienz der transgenen *g/l* Pflanzen mit den Konstrukten R163 bis R165, R169 bis R171, pGL2::GL1, pATML1::GFP::GL1, und der Kontrolle *Ler*

Darstellung der Rettungseffizienz der Konstrukte R169-171, pGL2::GL1 und pATML1::GFP::GL1 in *g/l(39F12)* Hintergrund, zum Vergleich ist der Wildtyp *Ler* gezeigt. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1, 2, 3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation ($n = 100$, außer *Ler* $n = 50$).

Tabelle 12: Maximale Trichomzahlen der transgenen *g/l* Pflanzen mit den Konstrukten 169 bis R171, pGL2::GL1, pATML1::GFP::GL1, und der Kontrolle *Ler* auf den ersten, vier Rosettenblättern

	Blatt 1	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 4
R164-R165 <i>g/l(39F12)</i>	0	0	0	0
R169-R170 <i>g/l(39F12)</i>	0	0	0	0
R170 <i>g/l(39F12)</i>	0	1	3	4
pGL2::GL1 <i>g/l(39F12)</i>	6	10	22	31
pATML1::GFP::GL1 <i>g/l(39F12)</i>	14	14	34	44
<i>Ler</i>	14	16	36	46

2.4 Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des *WEREWOLF*-Gens

2.4.1 Eingrenzung des *WER*-Promotors

Im Zusammenhang mit der Charakterisierung des *WEREWOLF* (*WER*) Gens wurden bisher 4 kb 5'-Sequenz und 1,1 kb 3'-Sequenz zur Komplementierung und zur GUS-Reporteranalyse eingesetzt (Lee und Schiefelbein, 1999). Die GUS-Expression konnte in den Zellreihen der Wurzelepidermis detektiert werden, die sich zu Nicht-Wurzelhaaren entwickeln, und konnte von der meristematischen bis zur Elongationszone nachgewiesen werden (Lee und Schiefelbein, 1999).

Diese sehr große 5'-untranskribierte Region sollte weiter eingegrenzt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst ein ca. 2 kb großer 5'-Promotor Pr21 (-2026 bis -162, Abb. 60) ausgewählt und auf die Regulation der GUS-Expression in dem Konstrukt R20 geprüft.

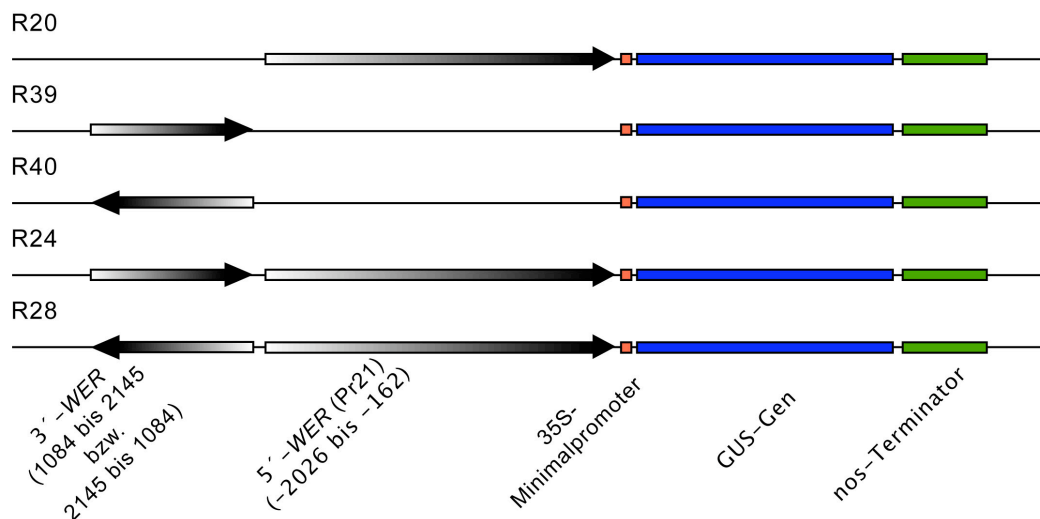


Abbildung 60: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R20, R39, R40, R24 und R28

Fusionen der regulatorischen Bereiche des 5'-Promotors und 3'-Enhancers von *WER* mit dem 35S-Minimalpromotor, dem GUS-Gen und dem nos-Terminator der Konstrukte R20, R39, R40, R24 und R28. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *WEREWOLF*.

Die Pflanzen R20 wiesen in der Primärwurzel das gleiche GUS-Expressionsmuster auf (Abb. 61A), wie das bereits veröffentlichte Reporterkonstrukt *WER::GUS* in Col Hintergrund (Abb. 61B, sowie Lee und Schiefelbein, 1999) mit einer Expressionsdomäne von der meristematischen bis zur Elongationszone. Schwache GUS-Färbung am Ende der meristematischen Zone der Wurzeln R20 im Gegensatz zu *WER::GUS* könnte auf schwache Unterschiede in der Expressionsstärke der beiden Konstrukte und Diffusion des GUS-Farbstoffs zurückzuführen sein. Dabei fiel auf, dass in beiden Konstrukten die Expression als Reihenmuster nur zu erahnen war. Um ein Überfärben zu verhindern, wurden die Pflanzen nur 1 Stunde in der Färbelösung inkubiert. Aber auch hier war es nicht möglich zu erkennen, dass sich die Expression nur auf die Nischthaarzellen beschränkt.

Vergleicht man dies mit der GUS- und GFP- Färbung in der Originalpublikation (Lee und Schiefelbein, 1999), so scheint GFP als Reporter eine bessere Auflösung zu ermöglichen.

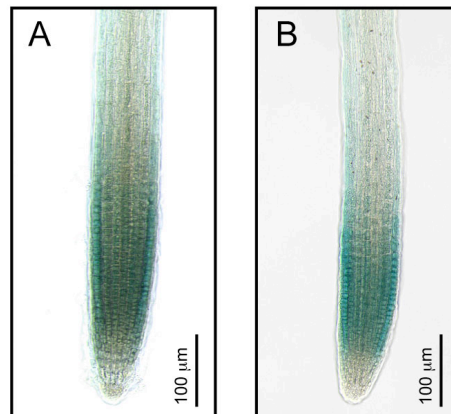


Abbildung 61: Expression der Konstrukte R20 und WER::GUS in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotors Pr21 des *WEREWOLF* Gens in dem Konstrukt R20 in *Ler* Hintergrund (A) im Vergleich zum WER::GUS-Konstrukt (Lee und Schiefelbein, 1999) in *Col* Hintergrund (B). Gezeigt sind die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge nach 1 Stunde GUS-Färbung.

Da für *WER* zurzeit keine Rettungsanalysen für den 5'-Promotor ausgewertet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der 3'-Bereich eine Funktion für die *WER*-Expression besitzt. Um die Rolle der 3'-Region des *WER*-Gens zu untersuchen, wurde die untranskribierte 3'-Region „3'-*WER*“ (1084 bis 2145 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *WER*) in beiden Orientierungen (R39, R40) und in Kombination mit dem 5'-Promotor Pr21 (R24, R28) als regulatorische Information für die GUS-Expression genutzt (Abb. 60).

Die GUS-Expression, die nur durch den 3'-Bereich vermittelt wurde, zeigte in der *in Vivo* Orientierung (R39) die gleiche Färbung in der Primärwurzel wie in der umgekehrten (R40) (Abb. 62A, B, E, F). Der Vergleich mit den Pflanzen R24 und R28, die den 5'-Promotor und die 3'-Sequenz enthalten (Abb. 62C, D, G, H), zeigte, dass deren Expressionsdomäne früher in der meristematischen Zone begann und in älteren Entwicklungszonen noch aktiv war. Diese Tendenz war nach einer Stunde Färbung zu erahnen (Abb. 62A-D) und wurde nach 2,5 Stunden Färbung sehr deutlich (Abb. 62E-H). Die Kombination von 5'- und 3'-Bereiche vermittelte die gleiche GUS-Expression wie der 5'-Promotor alleine (vgl. Abb. 61A mit 62C, D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der 5'-Promotor Pr21 dieselbe GUS-Expression dirigierte, wie das Konstrukt WER::GUS (Lee und Schiefelbein, 1999). Die 3'-Sequenz war in der Lage GUS-Expression in der Wurzel zu vermitteln, wenn sie vor dem 35S-Minimalpromotor lokalisiert ist. Dabei spielte die Orientierung keine Rolle. Ihre Expressionsdomäne, die kürzer als in WER::GUS war, wurde in Kombination mit dem 5'-Promotor vom selbigen überdeckt.

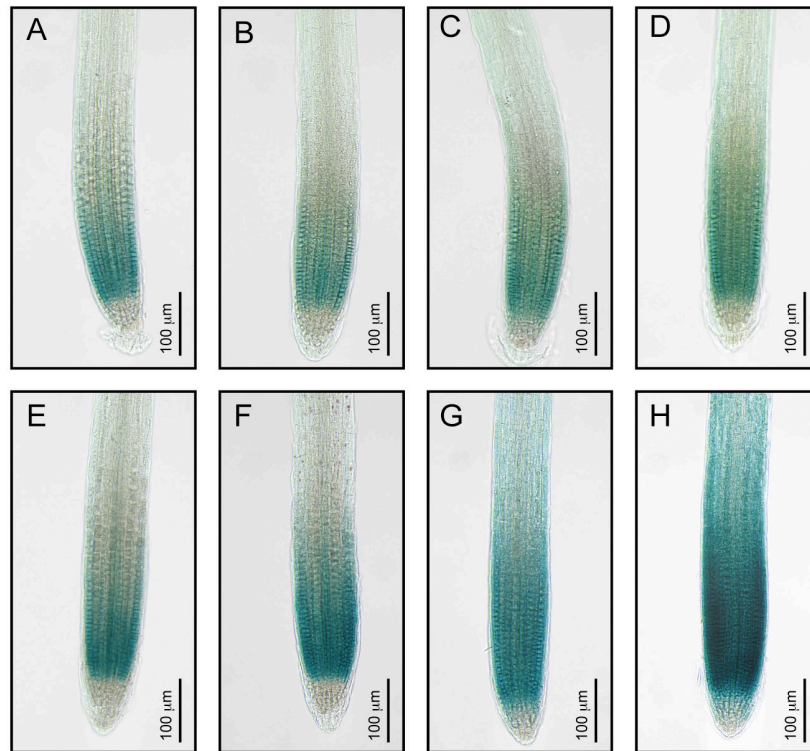


Abbildung 62: Expression der Konstrukte R39, R40, R24 und R28 in der Primärwurzel von *Ler* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression, die durch die 3'-Sequenz des *WEREWOLF* Gens in *in Vivo*-Orientierung in dem Konstrukt R39 (A, E) und umgekehrt in dem Konstrukt R40 (B, F) in transgenen *Ler* Pflanzen vermittelt wird. Außerdem wurde die 3'-Sequenz in der *in Vivo*-Orientierung mit dem 5'-Promotor Pr21 als R24 (B, F) bzw. in der umgekehrten Orientierung mit dem 5'-Promotor Pr21 als R28 (D, H) kombiniert. Gezeigt sind die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge nach 1 Stunde (A-D) bzw. 2,5 Stunden (E-H) GUS-Färbung.

2.4.2 Identifikation wichtiger regulatorischer Bereiche der 5'-Promotors von *WER*

Da der 5'-Promotor Pr21 die gleiche GUS-Expression wie das Konstrukt *WER*::GUS mit 5'- und 3'-Sequenzen vermittelte, wurden die weiteren Analysen des Promotors auf die 5'-Region beschränkt. Die Region des Promotors Pr21 wurde in drei überlappende Fragmente von -2026 bis -1251 (Pr18), von -1359 bis -624 (Pr19), von -819 bis -162 (Pr20) unterteilt (Abb. 63).

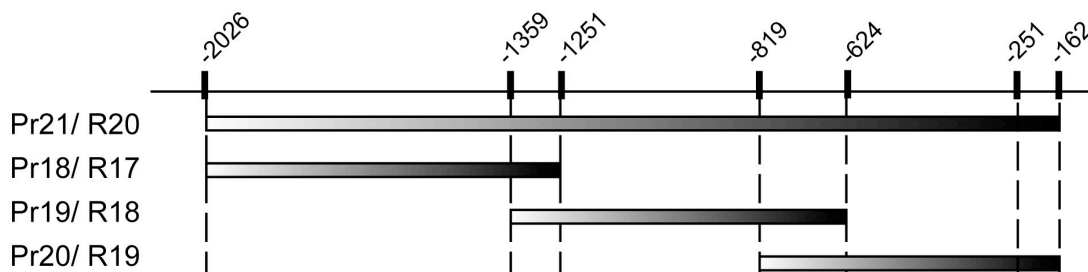


Abbildung 63: Überlappende Fragmente des 5'-Promotors von *WER*

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Fragmente des 5'-Promotors des *WEREWOLF* Gens in den Entry-Vektoren Pr18, Pr19, Pr20, Pr57 und Pr58 im Vergleich zu dem hier definierten 5'-Gesamtpromotor (Pr21). Nebstehend sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R17-R20, R101 und R102 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *WEREWOLF*.

Die GUS-Analyse der Pflanzen R17 (Pr18) (Abb. 64A) zeigte auch nach 24 Stunden Inkubation keinerlei Färbung in den Primärenwurzeln 5 Tage alter Keimlinge. In den Pflanzen R18 (Pr19) konnte nach einer Stunde und 4 Stunden Färbung GUS-Expression in einer begrenzten Domäne der Primärwurzel lokalisiert werden. Diese begann in der meristematischen Zone und endete zu Beginn der Elongationszone. Sie wies ein Streifenmuster auf (Abb. 64B, C). Die Pflanzen R19 (Pr20) zeigten eine zum Konstrukt R20 vergleichbare Expression (vgl. Abb. 64D, E und Abb. 61C). Dabei war die Expression bereits nach 4 Stunden Inkubation so stark, dass der GUS-Farbstoff wahrscheinlich aus den Zellen herausdiffundierte (Abb. 64E).

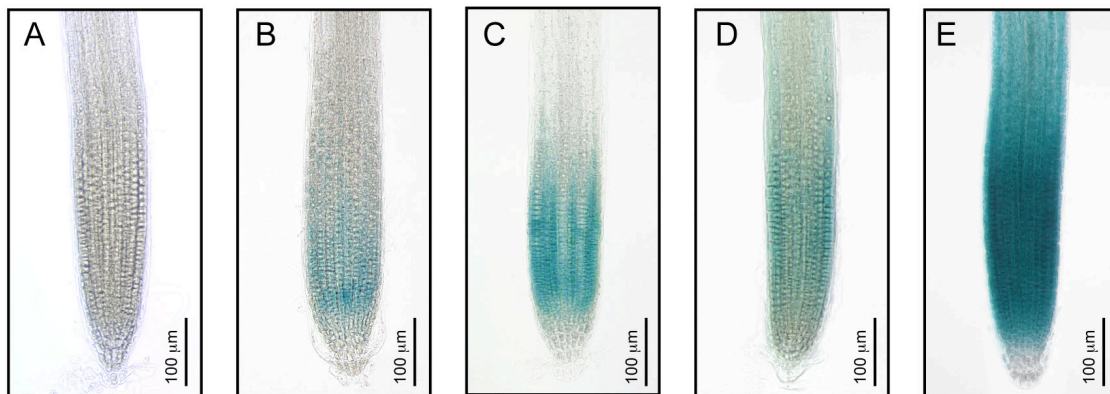


Abbildung 64: Expression der Konstrukte R17, R18 und R19 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente Pr18 bis Pr20 des *WEREWOLF* Gens in den Konstrukten R17 (A), R18 (B, C) und R19 (D, E) in *Ler* Hintergrund. Gezeigt sind die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge nach 24 Stunden (A), 1 Stunde (B, D) und 4 Stunden (C, E) GUS-Färbung.

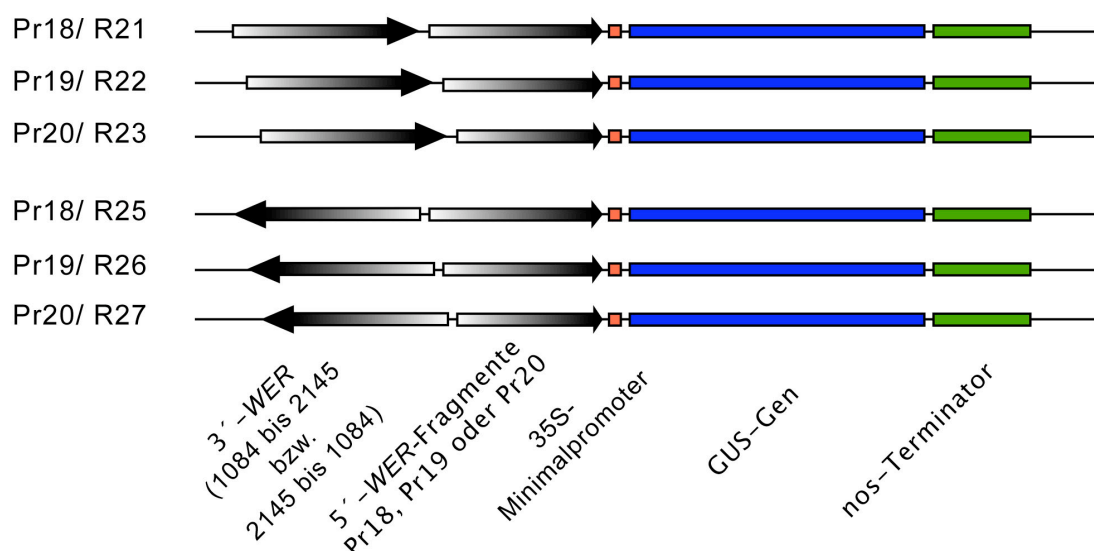


Abbildung 65: Schematische Darstellung der GUS-Konstrukte R21 bis R23 und R25 bis R27

Schematische Darstellung der Fusionen der regulatorischen Bereiche des 5'-Promotors und 3'-Enhancers von *WER* mit dem GUS-Gen der Konstrukte R21, R22, R23, R25, R26 und R27. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *WEREWOLF*.

Die Fusion der 3'-Sequenz von (1084 bis 2145) in *in Vivo* und umgekehrter Orientierung vor die einzelnen 5'-Promotorfragmente Pr18, Pr19 und Pr20 (Abb. 65) führte in den entsprechenden, transgenen Pflanzen zu veränderter GUS-Lokalisation gegenüber den Konstrukten, die nur die 5'-Promotorfragmente tragen.

Die Pflanzen R21 und R25 (Abb. 66A, exemplarisch für R21), die die 3'-Sequenz mit dem 5'-Promotorfragment Pr18 tragen, dirigierten GUS-Expression in die Primärwurzeln von der meristematischen bis zur Elongationszone, im Gegensatz zu R17 Pflanzen, die nur Pr18 als regulatorische Information besitzen und keine Expression aufwiesen (vgl. Abb. 64A). Dabei war die Expression länger und in älteren Zonen zu detektieren, als in den Pflanzen R39 und R40, die nur die 3'-Sequenz besitzen (vgl. Abb. 62E, F).

Die Pflanzen R22 und R26 (Abb. 66B, exemplarisch für R22), die die 3'-Sequenz und das 5'-Promotorfragment Pr19 als regulatorische Information tragen, zeigten GUS-Färbung von der meristematischen Zone bis zu Beginn der Elongationszone. Diese Expressionsdomäne war deutlich kürzer als in den Pflanzen R21 und R23 (vgl. Abb. 66A, C), aber stärker als nur das Promotorfragment Pr19 in den Pflanzen R18 (vgl. Abb. 64C). Das Streifenmuster von R18 war auch nicht mehr zu erkennen. Das Muster ähnelte der GUS-Expression, die die 3'-Sequenz alleine in den Pflanzen R39 und R40 vermittelte (vgl. Abb. 62E, F).

Die 3'-Sequenz in Kombination mit dem Promotorfragment Pr20 in den Pflanzen R23 und R27 vermittelte die gleiche starke Expression in den Primärwurzeln (Abb. 66C, exemplarisch für R23) wie Pr20 in den Pflanzen R19 alleine (vgl. Abb. 64E). Diese war nicht zu unterscheiden von der Expression, die der hier definierte 5'-Promotor Pr21 ohne mit der 3'-Region in den Pflanzen R20, R24 und R28 lieferte (vgl. Abb. 61A, 62G, 62H).

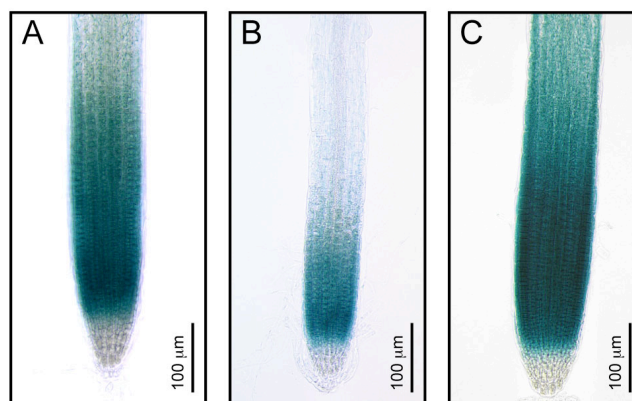


Abbildung 66: Expression der Konstrukte R21, R22 und R23 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente Pr18 bis Pr20 in Kombination mit der 3'-Region in Vorwärtsorientierung des *WEREWOLF* Gens in den Konstrukten R21 (A), R22 (B) und R23 (C) in *Ler* Hintergrund. Gezeigt sind die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge nach 4 Stunden GUS-Färbung.

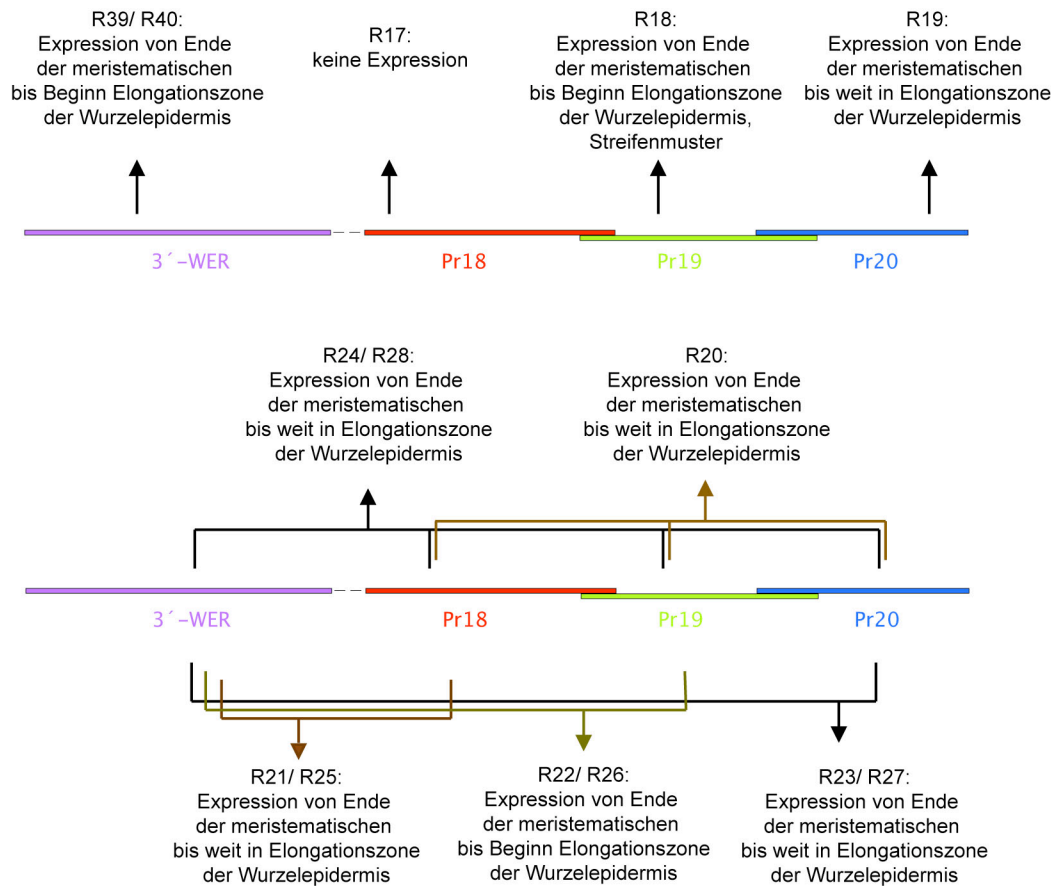


Abbildung 67: Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse des 5'-Promotors, der 5'-Promotorfragmente, der 3'-Region und ihrer Kombinationen von WER

Zusammenfassend lässt sich festhalten (Abb. 67), dass der Bereich des 5'-Promotor des *WER*-Gens Pr20 in der Primärwurzel zu der spezifischen GUS-Expression führte, die durch *WER::GUS* (Lee und Schiefelbein, 1999) charakterisiert wurde. Das mittlere 5'-Promotorfragment Pr19 lieferte eine kürzere und schwächere Expressionsdomäne, in der aber das beschriebene Streifenmuster der Expression zu erkennen ist. In Kombination mit der 3'-Sequenz wurde sie von dieser überdeckt. Das distale 5'-Promotorfragment Pr18 vermittelte keine GUS-Expression in der Primärwurzel, allerdings konnte es in Kombination mit der 3'-Sequenz deren Expression auf die Stärke der gesamten, regulatorischen Information bestehend aus 5'-Promotor Pr21 und 3'-Sequenz verstärken.

2.4.3 Deletionen der WER-Promotorfragments Pr19 und Pr20

Das Promotorfragment Pr19 (-1359 bis -624) zeigte in dem entsprechenden Konstrukt R18 eine schwache Färbung in der Primärwurzel und vermittelte das beschriebene Reihenmuster. Um die verantwortliche, regulatorische Information zu erfassen, wurde das Promotorfragment Pr19 deletiert (s. Abb. 68).

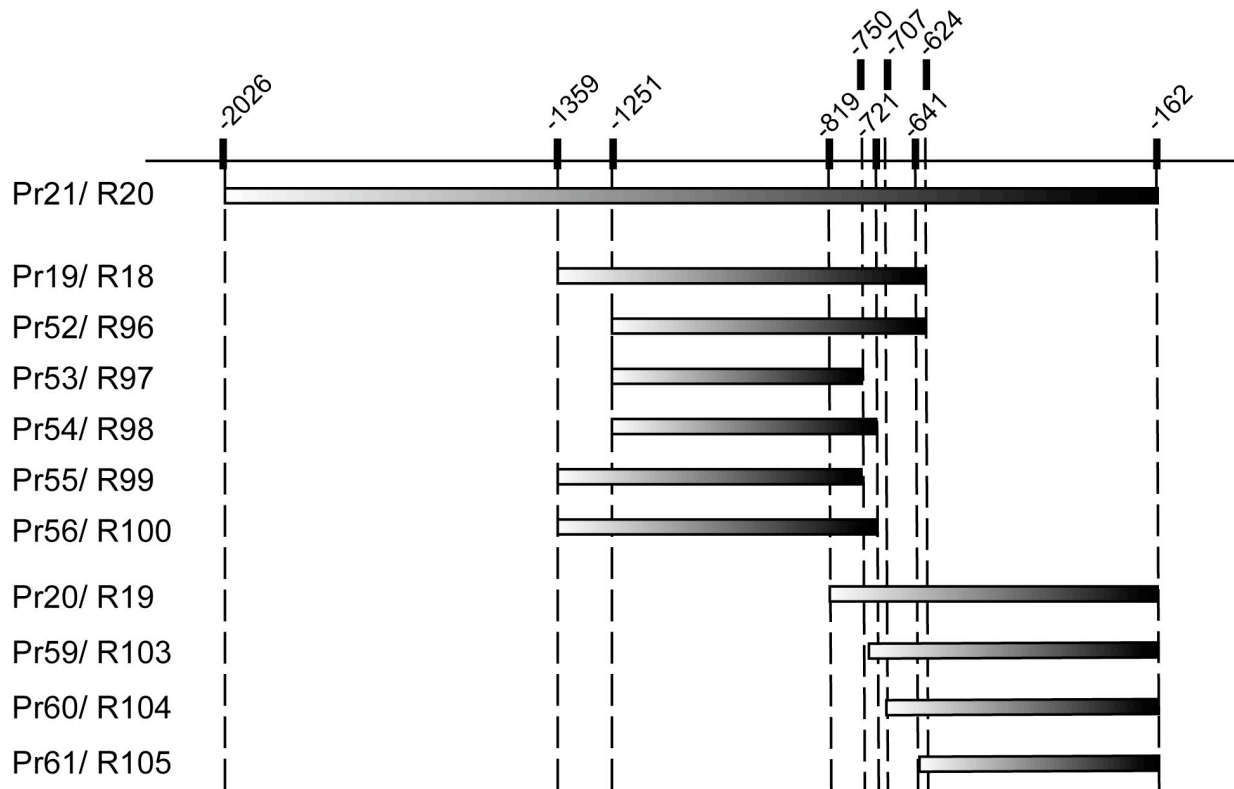


Abbildung 68: Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr19 und Pr20 des *WEREWOLF*-Gens

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr19 und Pr20 im Vergleich zu dem hier definierten 5'-Gesamtpromotor (Pr21) des *WEREWOLF* Gens. Die Entry-Vektor Pr52 bis Pr57 stellen Deletionen des Fragments Pr19 dar, und Pr59-Pr61 sind Deletionen des Fragments Pr20. Nebenstehend sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R18 mit den Deletionen R96-R100 und R19 mit den Deletionen R103-R105 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *WEREWOLF*.

Die Deletion der Sequenz von -1359 bis -1252 in dem Fragment Pr52 führte zu keiner auffälligen Veränderung der GUS-Expression in den Pflanzen R96 gegenüber R18 (vgl. Abb. 58A mit Abb. 54B). Ebenso vermittelte die proximale Deletion der Nukleotide -720 bis -624 der Fragmente Pr54 und Pr56 in den Pflanzen R98 und R100 keine Änderung (Abb. 69C, 69E). Die Entfernung weiterer Nukleotide von -721 bis -749 in den Fragmente Pr53 und Pr55 bewirkte allerdings eine starke Einschränkung der GUS-Expression auf wenige Zellen der meristematischen Zone und der angrenzenden Elongationszone in den Primärwurzeln der entsprechenden Pflanzen R97 und R99 (Abb. 69B, D).

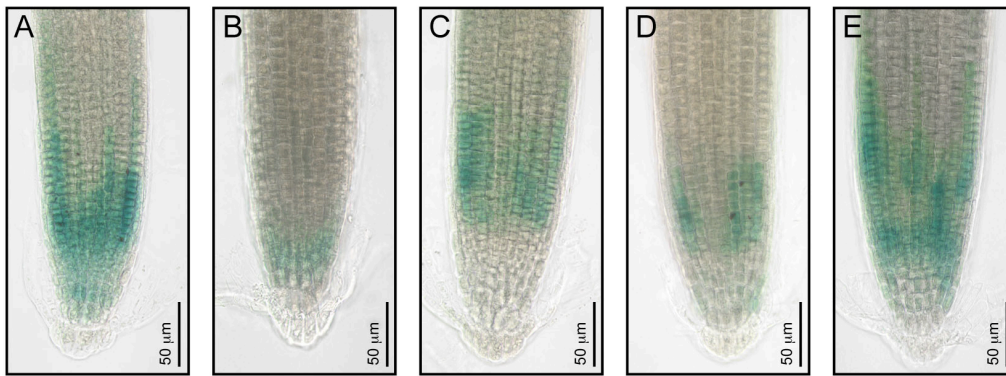


Abbildung 69: Expression der Konstrukte R96 bis R100 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente Pr52 bis Pr56 des *WEREWOLF* Gens in den Konstrukten R96 (A), R97 (B), R98 (C), R99 (D) und R100 (E) in Ler Hintergrund. Gezeigt sind die Primärwurzeln 5Tage alter Keimlinge nach 24Stunden GUS-Färbung.

Das Promotorfragment Pr20 (R19) zeigte eine dem 2 kb 5'-Promotor (Pr21) entsprechende GUS-Expression. Aus diesem Grund wurden hier Deletionen im Bereich zum benachbarten Fragment Pr19 durchgeführt (s. Abb. 68).

Die Deletionen in den Fragmenten Pr59, Pr60 und Pr61 (R103 bis R105) führten zum Erhalt der GUS-Expression von der meristematischen Zone bis zur Elongationszone (Abb. 70 A-C). Allerdings bewirkten die Deletionen Unterschiede in der Expressionsstärke. Das Fragment Pr59 mit der Sequenz von -741 bis -162 vermittelte dieselbe Stärke in den Pflanzen R103 (Abb. 70A) wie R19 (Pr20, -819 bis -162, vgl. Abb. 64D, E). Eine weitere Deletion im Fragment Pr60 (-708 bis -162) minimierte die Expressionsstärke, so dass das Streifenmuster der Wurzelepidermis der Pflanzen R104 nun gut erkennbar war (Abb. 70B). Eine zusätzliche Deletion in dem Fragment Pr61 (-642 bis -162) führte in den Pflanzen R105 zum selben Erscheinungsbild (Abb. 70C).

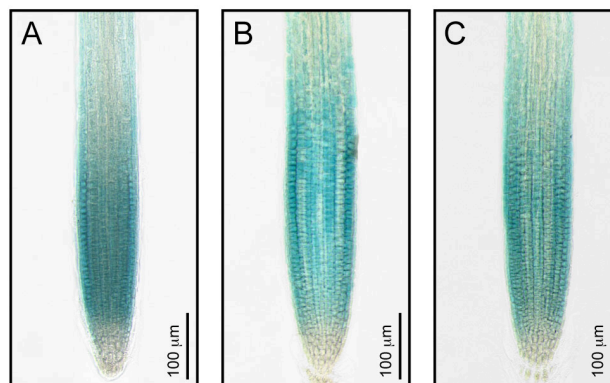


Abbildung 70: Expression der Konstrukte R103, R104 und R105 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente Pr59, Pr60 und Pr61 des *WEREWOLF* Gens in den Konstrukten R103 (A), R104 (B) und R105 (C) in Ler Hintergrund. Gezeigt sind die Primärwurzeln 5 Tage alter Keimlinge nach 1 Stunde GUS-Färbung.

Folglich konnte der Sequenz von –721 bis –749 (siehe orange Domäne in Abb. 71) für die Expression des mittleren 5'-Promotorfragments (Pr19), und dem Bereich von –741 bis –707 (s. orange Domäne in Abb. 71) für die Expression des proximalen 5'-Promotorfragments (Pr20) in der Primärwurzel wichtige regulatorische Information für die Verstärkung zugesprochen werden. Hingegen war der Bereich von –641 bis –162 für die Festlegung des spezifischen Reihenusters von Pr20 wichtig (siehe rote Domäne in Abb. 71), und der Bereich von –1251 bis –721 (s. blaue Domäne in Abb. 71) trägt wahrscheinlich einen Teil der spezifischen Information von Pr19

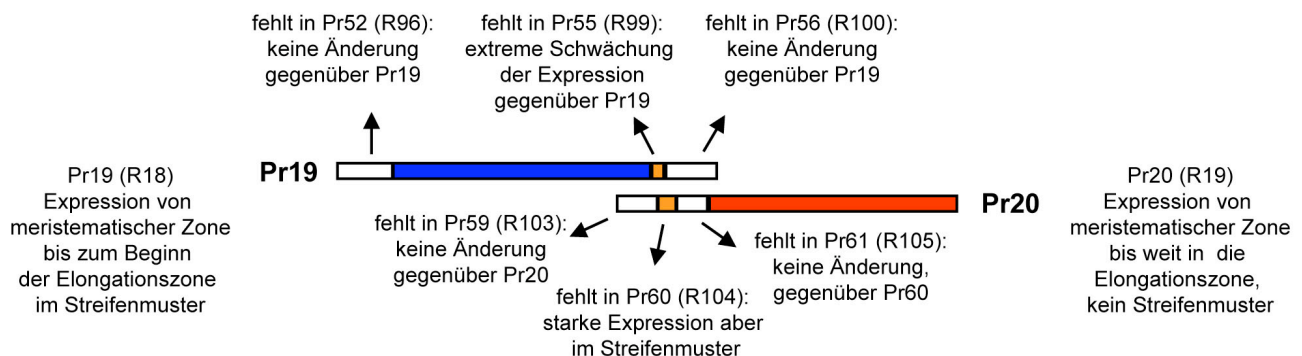


Abbildung 71: Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen der 5'-WER-Fragmente Pr19 und Pr20

In Farbe sind die einzelnen Bereiche dargestellt, die durch Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr19 und Pr20 untersucht wurden. Den weißen Domänen konnte dem zufolge keine Funktion zugewiesen werden. Die orangenen Domänen haben sowohl für Pr19 als auch für Pr20 verstärkende Funktion. Die rote Domäne trägt die gesamte Information für die Expression des Streifenmusters in der Epidermis. Die blaue Domäne vermittelt nur noch in wenigen Zellen innerhalb der meristematischen Region Expression.

2.4.4 In Silico Untersuchung der 5'-Promotors von WER

Da das proximale Promotorfragment Pr20 (–810 bis –162) alle regulatorische Information trägt, die die charakteristische GUS-Expression für WEREWOLF vermittelte, wurde eine detaillierte PLACE-Datenbankanalyse (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) für diesen Sequenzbereich durchgeführt. Der Abb. 72 können die identifizierten Elemente entnommen werden. Es wurde eine Unterteilung in der Sequenz vorgenommen, da der erste Teil von Pr20, der in Pr61 deletiert wurde, nicht wichtig für das Expressionsmuster war, sondern nur einen Hinweis auf die Expressionsstärke lieferte. Pr20 überlappt mit Pr19, und deshalb wurden auch die Enden von Pr19 und dessen Deletionsfragmente Pr53 und Pr54 angegeben. Eine kritische Auseinandersetzung mit den cis-regulatorischen Elementen erfolgt in der Diskussion.

Für die regulatorischen Sequenzen des WER-Gens hat sich gezeigt, dass das Fragment Pr20 von Bedeutung ist. Aber auch das Fragment Pr19 und der 3'-Bereich, sowie in Kombination mit diesem das Fragment Pr18 enthielten regulatorische Information für die epidermale Expression in der Wurzel. Das Alignment dieser Sequenzen konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da die

Sequenzen zu unterschiedlich sind. Die Motiv-Suche führte zu keinen aufschlussreichen Hinweisen über wichtige DNA-Bereiche. Aus diesem Grund wurde der Vergleich der cis-regulatorischen Elemente für die einzelnen regulatorischen Fragmente durchgeführt (Tab. 13). Dabei konnten für einige Elemente festgestellt werden, dass sie in mehreren Fragmenten auftreten, andere aber auch nur ein einziges Mal vorzufinden sind. Es konnten einige Elemente identifiziert werden, die im Zusammenhang mit den Phytohormonen ABA, Auxin, Ethylen und Salicylsäure stehen. Aber auch Verbindungen zu Licht-, Phytochrom-, Phosphatmangel-, Niedrigtemperatur-, Hypoosmolarität-regulierter, Abwehr bezogener und circadianer Expression konnten festgestellt werden.

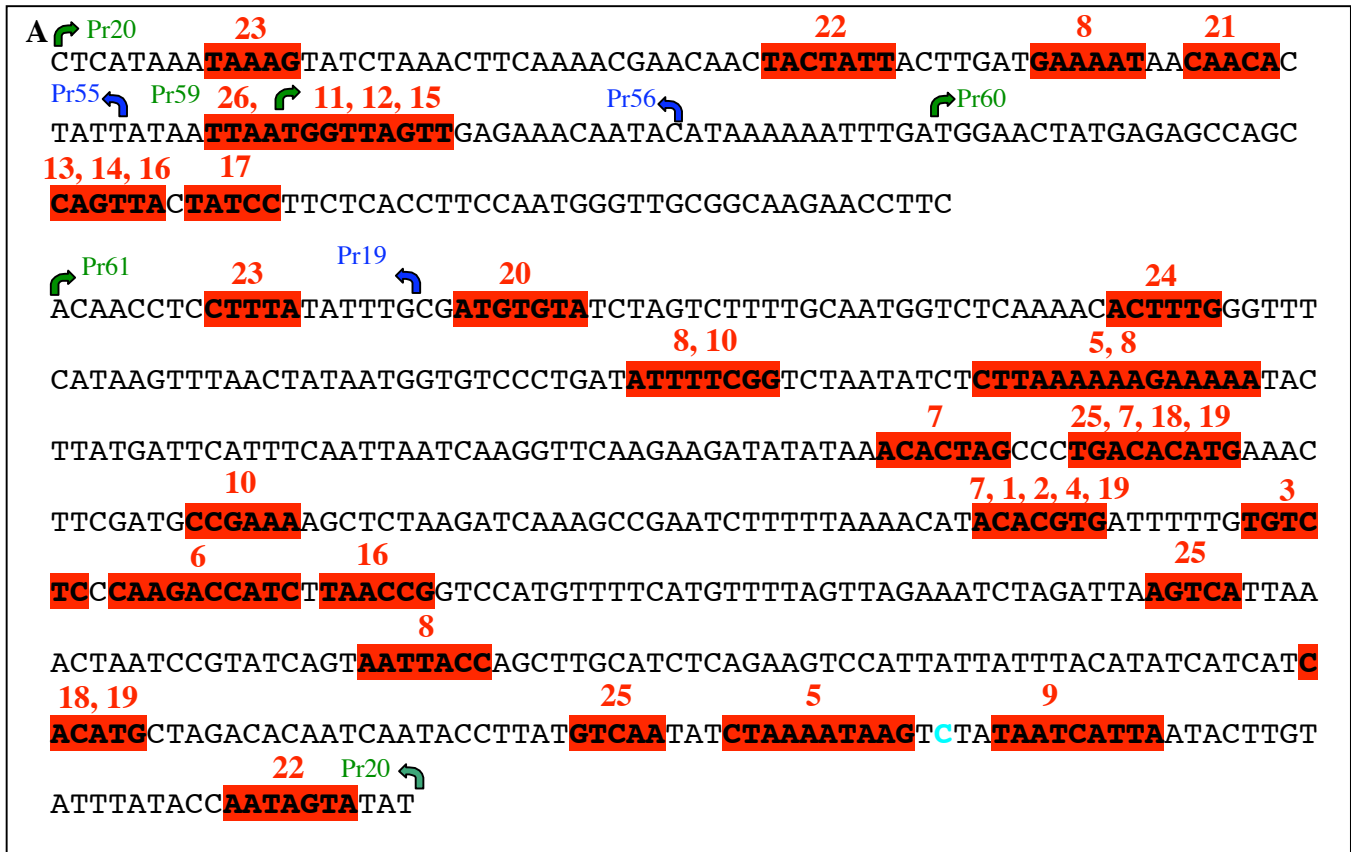


Abbildung 72: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr20 von *WER*

B

Nr.	Cis-Element	Sequenz	Bindender Faktor	Organismus	Gen/ Funktion
1	ABRELATERDI	ACGTG	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1, Trockenstress und dunkelinduzierte Seneszenz
2	ACGTATERDI	ACGT	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1
3	ARFAT	TGTCTC	ARF1 (Auxin Response Factor)	Arabidopsis thaliana, Glycine max	Frühe Auxin-Response-Gene
4	CACGTGMOTIF (G-BOX)	CACGTG	GBF4, CrGBF1, CrGBF2	Arabidopsis thaliana, Catharanthus roseus	SAUR15A, NDE, GH3, D1, D4 beta-Phaseolin (Embryogenese) STR
5	CARGCW8GAT	CWWWWWWWWG	PTI4	Lycopersicon esculentum	Abwehr bezogen
6	CIANCADIANLELHC	CAANNNNATC	AGL15 (MADS-BOX-TF)	Arabidopsis thaliana	
7	DPBFCOREDCDC3	ACACNNG	bZIP: DPBF1,2	Lycopersicon esculentum	Lhc, Circadiane Expression
8	GT1CONSENSUS	GRWAAW	ABI5	Daucus carota	DC3
			GT1-BF	Arabidopsis thaliana	Licht-Regulation, SA-Induktion
9	HDZIP2ATATHB2	TAAATMATT	ATHB2	Pisum sativum	
10	LTREIHVBLT49	CCGAAA		Avena sativa	
11	MYB1AT	WAACCA	MYB	Oryza sativa	
12	MYB1LEPR	GTTAGTT	PTI4	Nicotiana tabacum	
13	MYB2AT	TAACTG	ATMYB2	Arabidopsis thaliana	Abwehr bezogen
14	MYB2CONSENSUSAT	YAAACKG	ATMYB2	Arabidopsis thaliana	Trockenstress, ABA-Signaltransduktion
15	MYBATRD22	CTAACCA	ATMYB2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
16	MYBCORE	CNGTTR	ATMYB2, ATMYB1	Arabidopsis thaliana	MYBCORE
17	MYBST1	GGATA	MYB	Solanum tuberosum	
18	MYCATERD1	CATGTG	NAC	Arabidopsis thaliana	Dehydratisierung
19	MYCATRD22	CACATG	MYCATRD22	Arabidopsis thaliana	ABA-Induktion
20	MYCCONSUSAT	CANNNG	ATMYC2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
21	EBOXNAPA	CANNNG			
22	NAPINMOTIFBN	TACACAT		Brassica napus	Napin
23	RAV1AAT	CAACA	RAV1	Arabidopsis thaliana	Element RAV1A in Kombination mit RAV1B
24	SP8BFIBSP8BIB	TACTATT		Ipomoea batatas	In Rosettenblättern und Wurzel
25	TAAAGSTKSTI	TAAAG	SP8BF	Solanum tuberosum	Sporamin, beta-Amylase
26	TBOXATGAPB	ACTTTG	DOF1	Arabidopsis thaliana	KST1, Schließzellen spezifische Expression
27	W-BOX	(T)(T)TGACY	WRKY		GAPB (-94 bis -89, und -84 bis-79)
28	WBOXATNPR1	TTGAC	WRKY	Arabidopsis thaliana	NPR1 (+70 und +79), SA-Induktion
29	WBOXHVISOI	TGACT	SUSIBA2	Hordeum vulgare	ISO1
30	WBOXNTERF3	TGACY	WRKY	Nicotiana tabacum	ERF3, Verwundung

26	WRKY71OS WUSATAg	TGAC TTAATGG	WRKY711 WUS	Oryza sativa Arabidopsis thaliana	Amy32b, GA-Signaltransduktion AGAMOUS-Intron
----	---------------------	-----------------	----------------	--------------------------------------	---

Abbildung 72: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr20 von WER

In A ist die Sequenz der 5'-Promotorfragments Pr20 dargestellt. Im ersten Abschnitt befindet sich die Sequenz von -819 bis -642, die in Pr61 im Gegensatz zu Pr20 deletiert ist und im zweiten Abschnitt die Sequenz Pr61 von -641 bis -162 bezogen auf den endogenen Translationsstart von *WERWOLF*. Die Nummern in **rot** geben die Zuweisung zu den in B aufgeführten cis-regulatorischen Elementen an. Sie befinden sich über den entsprechenden **rot** unterlegten Nukleotiden, die das jeweilige Element charakterisieren. Die gebogenen Pfeile kennzeichnen den Anfang bzw. das Ende der Promotorfragmente, die jeweils daneben zu finden sind: **Pr20** mit Deletionen **Pr59**, **Pr60**, **Pr61** und das Ende von **Pr19** mit den Deletionen **Pr55** und **Pr56**. In **türkis** ist der identifizierte Transkriptionsstart markiert (Schiefelbein, 1999, AF126399).

In B sind die cis-regulatorischen Elemente mit zugehöriger Nukleotidsequenz, den bindenden Transkriptionsfaktoren (sofern bekannt), den Organismen, in den sie untersucht wurden, sowie das Gen, die Funktion bzw. der Stoffwechselweg, in dem sie identifiziert wurden, aufgelistet. Alle unwahrscheinlichen Elemente, wie z.B. PolyA-Signale, Pollen sowie *Agrobacterium* spezifischen Elemente, weitere TATA- und CAAT-Boxen wurden nicht in die Liste aufgenommen. Außerdem wurden die Bindungsstellen, die nur durch 4 Nukleotide gekennzeichnet sind (DOFCORE, ARR1AAT, CACTFTPPCA1, GATA-Box), aufgrund ihrer Vielzahl außer Acht gelassen.

Tabelle 13: Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente in den verschiedenen 5'-Promotorfragmenten und des 3'-Bereichs von WER

Für jedes cis-regulatorische Element ist aufgelistet, wie oft es in dem jeweiligen Fragment vorkommt. Die cis-Elemente sind funktionalen Kategorien zugeordnet, soweit dies möglich ist. Die Farbkodierung der Zellen spiegelt wider, in wie vielen der fünf Fragmente ein spezifisches Element auftritt (**vier**, **drei**, **zwei**). Die Zahl in den Klammern entspricht der cis-Elementnummer in Abb. 67.

Funktionale Kategorie	Cis-regulatorische Elemente	5'-WER (Pr18)	5'-WER (Pr19)	5'-WER (Pr20)	3'-WER (1084 bis 2145)
Expression			Meristematische bis Beginn Elongationszone, Streifenmuster	Meristematische bis weit in Elongationszone, sehr stark	Meristematische bis Beginn Elongationszone, sehr stark
ABA	ACGTATERD1	1	3	2	3
ABA	ABRELATERD1	1	1	2	-
ABA	CACGTGMOTIF	-	-	1	-
ABA	DPBFCOREDCDC3	-	-	3	1
ABA	MYB1AT	1	3	1	1
ABA	MYBATRD22	-	1	1	-
ABA	MYCATERD1/ MYCATRD22	1	1	2	-
ABA	MYB2CONSENSUSAT	-	1	1	2
Abwehr	ELRECOREPCR1	-	-	-	1
Abwehr	MYB1LEPR	-	1	1	-
Abwehr	SEBFCONSSTPR10A	1	1	-	1
Abwehr	SP8BFIBSP8BIB	-	3	2	-
Abwehr	WBOX	5	5	3	6
Auxin	ARFAT	-	-	1	-
Circadian	CIANDIANLELHC	3	1	1	-
Ethylen	ERELEE4	1	1	-	-
GA	AMYBOX1/ GAREAT/ MYBGAHV	1	-	-	3
GA	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	-	1	-	-
GA	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	-	-	-	1
Hypoosmolarität	PREATPRODHDH	1	-	-	-
Licht	IBOXCORE	2	2	-	2
Licht	TBOXATGAPB	1	2	1	1
Licht, SA	GT1CONSENSUSAT	6	10	4	8
Niedrigtemperatur	LTRE1HVBLT49	-	-	2	-
Phosphat	P1BS	-	-	-	1
Phytochrom	REALPHALGLHCB21	-	1	-	2
Trockenstress	MYB2AT	-	1	1	1
	ACGTABOX	-	1	-	1
	AMYBOX2	1	1	-	-
	BOXHINTPATPB	1	1	-	1
	CANBNNAPA	-	-	-	1
	CARGCW8GAT	-	-	2	3
	HDZIPATATHB2	-	-	1	-
	MYBCORE	-	1	2	3
	MYBPLANT	-	-	-	1
	MYBPZM	-	-	-	1
	MYBST1	2	2	1	1
	MYCCONSSENSUSAT	1	1	3	-
	NAPINMOTIFBN	-	-	1	1
	RAV1AAT	3	2	1	6
	RBCSCONSSENSUS	-	1	-	1
	RYREPEATBNNAPA	-	-	-	1
	SIFBOXSORPS1L21	1	-	-	-
	TAAAGSTKST1	-	4	2	1
	TATCCAOSAMY	2	1	-	2
	TGTACACMCUCUMISIN	1	1	-	1
	WUSATag	-	1	1	-

2.5 Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des *TRIPTYCHON*-Gens

2.5.1 *GUS*-Expression unter dem *TRY*-Promotor mit dem Vektorsystem *PARB*

Die *TRIPTYCHON* Expression wurde bereits durch GUS- und *in Situ*-Analyse charakterisiert (Schellmann *et al.*, 2002). Dabei wurden 1,4 kb genomische 5'-DNA (-1465 bis -4) mit dem GUS-Gen transkriptionell fusioniert. Entsprechend der *in Situ* Hybridisierung ist die *TRY*-Expression am stärksten in sich entwickelnden, sowie adulten Trichomen, in der gesamten Epidermis junger Blätter dagegen etwas schwächer (Schellmann *et al.*, 2002, s. auch Abb. 73I-L).

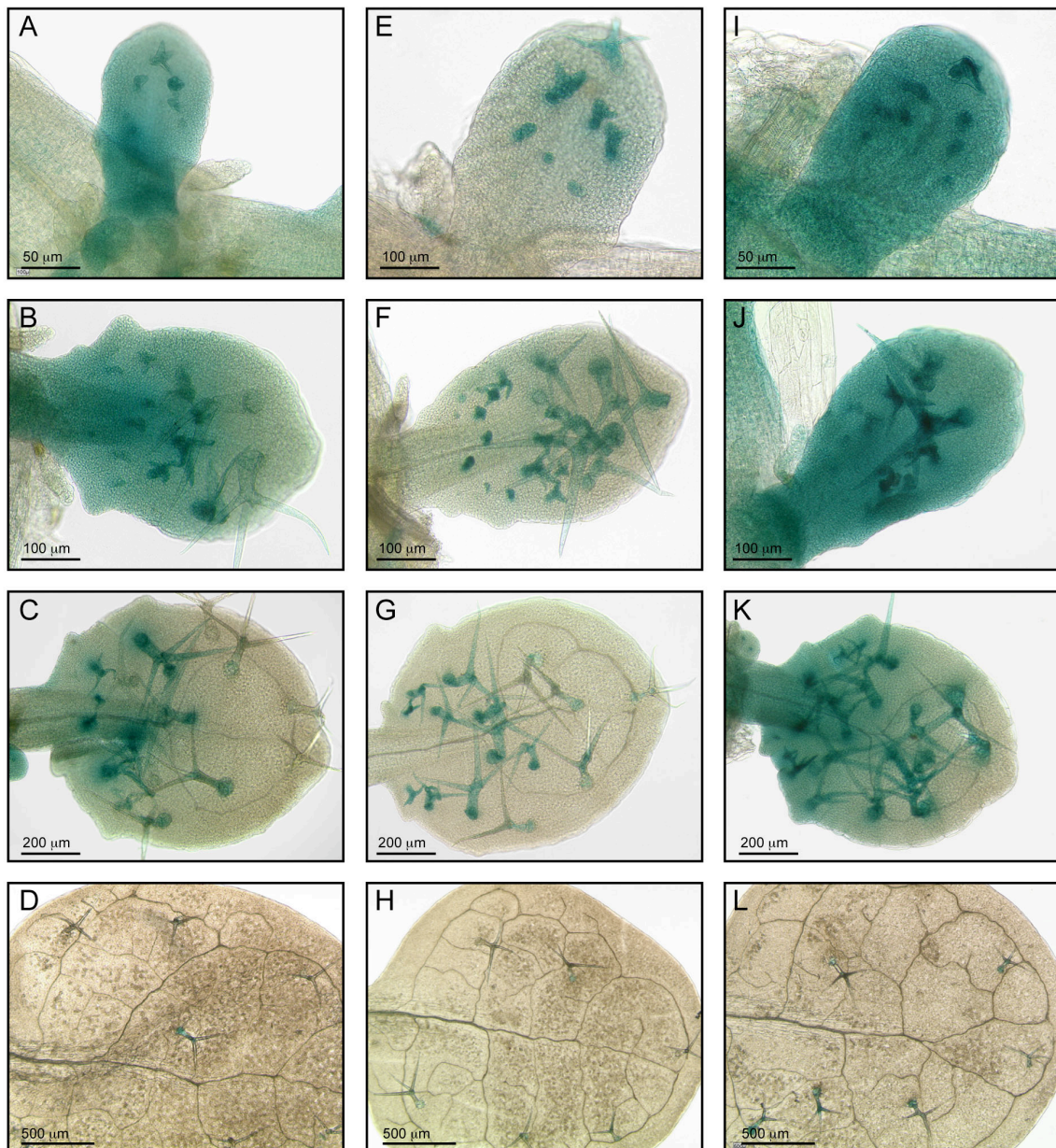


Abbildung 73: Expression der Konstrukte R81, R32 und TRY::GUS in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression des 5'-Promotors des *TRIPTYCHON*-Gens mit den Konstrukte R81 (A-D), R32 (E-H) und TRY::GUS (Schellmann *et al.*, 2002) (I-L) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils vier verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

Um zu überprüfen, ob der Vektor PARB dieselbe Expression liefert, wurde der untranslatierte 5'-Bereich von -176 bis -4 (Fragment-33) in den Vektor PARB vor den 35S-Minimalpromotor fusioniert. Dieser Bereich allein lieferte keine Expression in der jungen Blättern oder den Trichomen, wie der Vektor R83 zeigte (ohne Abb.). Die Kombination der 5'-Promotorregion von -1814 bis -177 (Pr16) mit Fragment-33 in dem Konstrukt R81 trägt folglich die gesamte Promotorregion von -1814 bis -4 und lieferte die für den 5'-Promotor bereits beschriebene GUS-Expression in jungen und adulten Trichomen in Kombination mit der ubiquitären Expression in jungen Blättern (Abb. 73A-D). Wurde nur die 5'-Promotorregion von -1814 bis -176 (Pr16) als regulatorischer Bereich für die GUS-Expression genutzt (R32), zeigte sich, dass dieses Konstrukt in den entsprechenden, transgenen Pflanzen die GUS-Expression wie bei R81 in die Trichome dirigierte (Abb. 73E-H), während keine ubiquitäre Blattexpression vorhanden war. Außerdem konnten nur wenige Linien identifiziert werden, die Expression aufwiesen. Damit verstärkt das proximale Fragment-33 die Expression und ist für die ubiquitäre Blattexpression essentiell.

2.5.2 Eingrenzung des TRY-Promotors

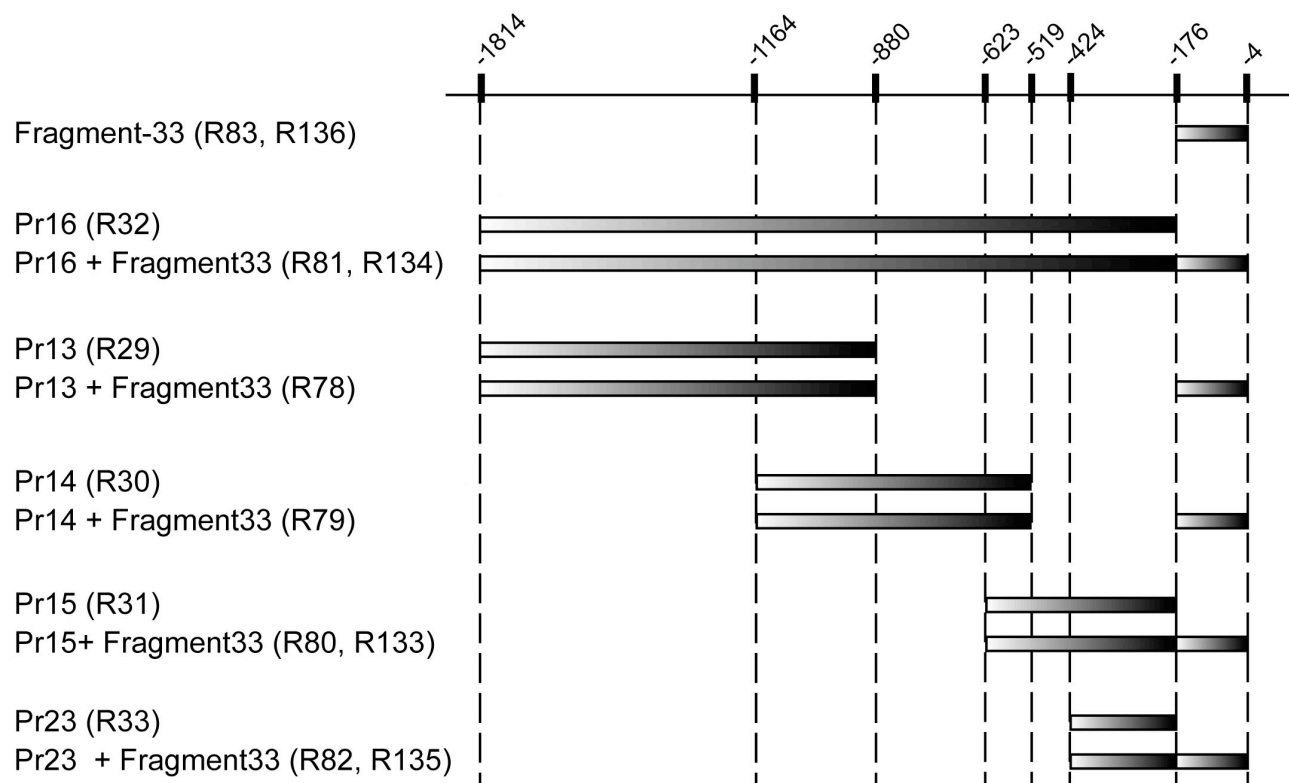


Abbildung 74: Fragmente des 5'-Promotors von TRY

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Fragmente des 5'-Promotors des *TRIPTYCHON*-Gens in den Entry-Vektoren Pr13, Pr14, Pr15 und Pr23 und des Fragments-33 im Vergleich zum 5'-Gesamtpromotor Pr16. Nebenstehend sind zum einen die zugehörigen GUS-Konstrukte R30-R33 ohne Fragment-33 und R78 bis R83 mit Fragment-33, sowie zum anderen die Rettungskonstrukte R133-136 mit Fragment-33 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *TRIPTYCHON*.

Die Region, die die *TRIPTYCHON*-Expression vermittelt, sollte weiter eingegrenzt werden. Dazu wurde die Gesamtsequenz von Pr16 in drei überlappende Fragmente (Pr13, Pr14 und Pr15) unterteilt. Das proximale Fragment Pr15 wurde nochmals zum Fragment Pr23 deletiert (Abb. 74). Die ersten beiden Promotorfragmente Pr13 (-1814 bis -880) und Pr14 (-1164 bis -519) zeigten mit den entsprechenden GUS-Konstrukten in den Pflanzen R29 und R30 und in Kombination mit dem Fragment-33 in den Pflanzen R78 und R79 keine Expression in den Blättern und in den Trichomen (ohne Abb.).

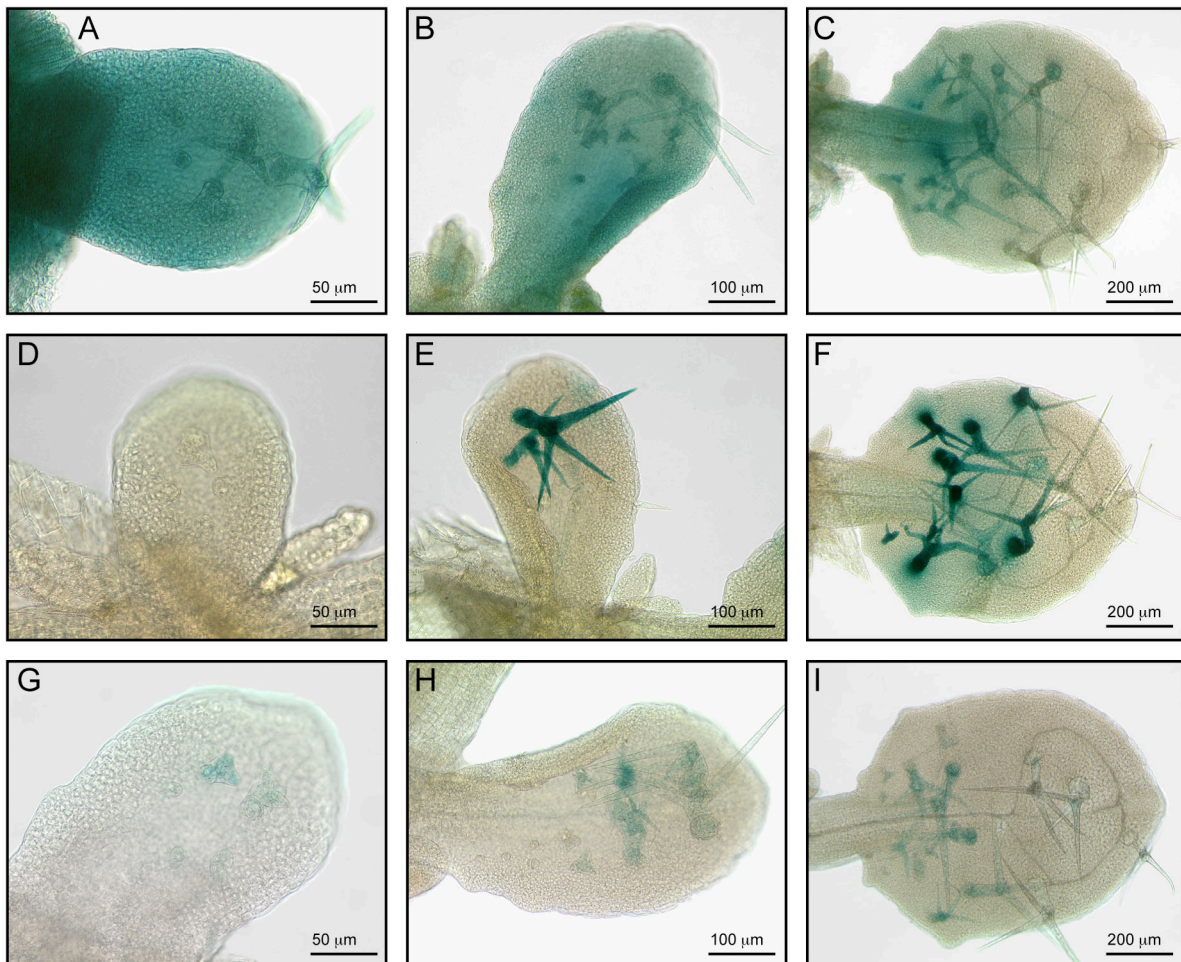


Abbildung 75: Expression der Konstrukte R80 und R82 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *TRIPTYCHON*-Gens Pr15 und Pr23 mit den Konstrukten R80 (A-C) und R82 (D-I) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Von R82 wird eine starke (D-F) und eine schwachen Linie (G-I) gezeigt. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

Das Promotorfragment Pr15 (-623 bis -176) wies in den Pflanzen R80 (Pr15 + Fragment-33, Abb. 75A-C) die gleiche Expression wie der Gesamtpromotor auf (R81, Pr16 + Fragment-33, vgl. Abb. 73A-C). Ohne den proximalen Bereich zeigten die Pflanzen R31 (nur Pr15, ohne Abb.) hingegen nur noch Expression in den Trichomen, wie für das vergleichbare Konstrukt R32 bereits demonstriert wurde (vgl. Abb. 73E-H).

Das Promotorfragment Pr23 (-424 bis -176), das eine Deletion des Fragments Pr15 darstellt, vermittelte in den Pflanzen R82 (Pr23 + Fragment-33, Abb. 75D-I) sowie in den Pflanzen R33 (nur Pr23, ohne Abb.) Expression in den Trichomen, aber ubiquitäre Expression konnte in den jungen Blättern für R82 und R33 Pflanzen nicht detektiert werden. Zu beachten ist, dass die Expression in den Trichomen nur von der Phase 3 bis 5 (oder evtl. 6?) der Trichomentwicklung zu detektieren war, während die Färbung in völlig ausgewachsenen Trichomen bereits verschwunden war (vgl. Abb. 75E und F sowie Abb. 75H und I). Die Expression in den Trichomen konnte sehr stark sein und führte möglicher Weise in manchen Linien zu Diffusion aus den Trichomen in die Nachbarzellen (Abb. 75E, F).

Damit kann man zusammenfassen, dass das Promotorfragment Pr15 in Kombination mit Fragment-33 die ganze Charakteristik der *TRIPTYCHON* Expression widerspiegelte, während das kleinere Fragment Pr23 mit und ohne Fragment-33 nur noch zeitlich begrenzte Trichomexpression aufwies, und die ubiquitäre Expression in den Blättern ausblieb.

2.5.3 Expression von *TRY* in *cpc try* Hintergrund

Die „Transkriptionsfaktoren“ *TRIPTYCHON* und *CAPRICE* spielen beide eine Rolle in der negativen Regulation der Trichom-Musterbildung und haben einen Einfluss auf die *TRY*-Expression in der Primärwurzel (Schellmann *et al.*, 2002). Aus diesem Grund sollte die Expression in der Funktionsverlust-Doppelmutante *cpc-1 try-82* für das Rosettenblatt charakterisiert werden, und die Expression, die durch die Promotorfragmente Pr16, Pr15, Pr23 und Fragment-33 vermittelt wird, sollte mit der des Gesamtpromotors (Pr16 + Fragment-33) verglichen werden.

Durch das Fragment-33 alleine wurde in den Pflanzen R83 *cpc try* keine Expression in den Rosettenblättern vermittelt (ohne Abb.). Die Pflanzen R81 *cpc try* (Pr16 + Fragment-33, Abb. 76A-C) zeigten eine starke ubiquitäre GUS-Expression in jungen Blättern, die auch im späteren Entwicklungsstadium des Blattes im Gegensatz zu der Expression in *Ler* Pflanzen (vgl. Abb. 73B) noch vorhanden war, im adulten Blatt aber verschwand (Abb. 76C). Die Expression in den Trichomen war über die gesamte Entwicklung bis nach der Reifung sehr stark, und GUS-Färbung in den die Trichome umgebenden Zellen konnte detektiert werden (Abb. 76C), die eventuell durch Diffusion aus den Trichomen erklärt werden kann. Die Pflanzen R80 *cpc try* (Pr15 + Fragment-33, Abb. 76D-F) zeigten die gleiche Expression wie die Pflanzen R81 *cpc try*.

In den Pflanzen R32 *cpc try* (nur Pr16 ohne Fragment-33, Abb. 76G-I) konnte im Gegensatz zum Wildtyp ubiquitäre GUS-Expression in jungen Blättern detektiert werden, die aber beim Auswachsen der Blätter verschwand. Außerdem konnte Expression in den Trichomen festgestellt werden, die bis zum adulten Zustand persistierte.

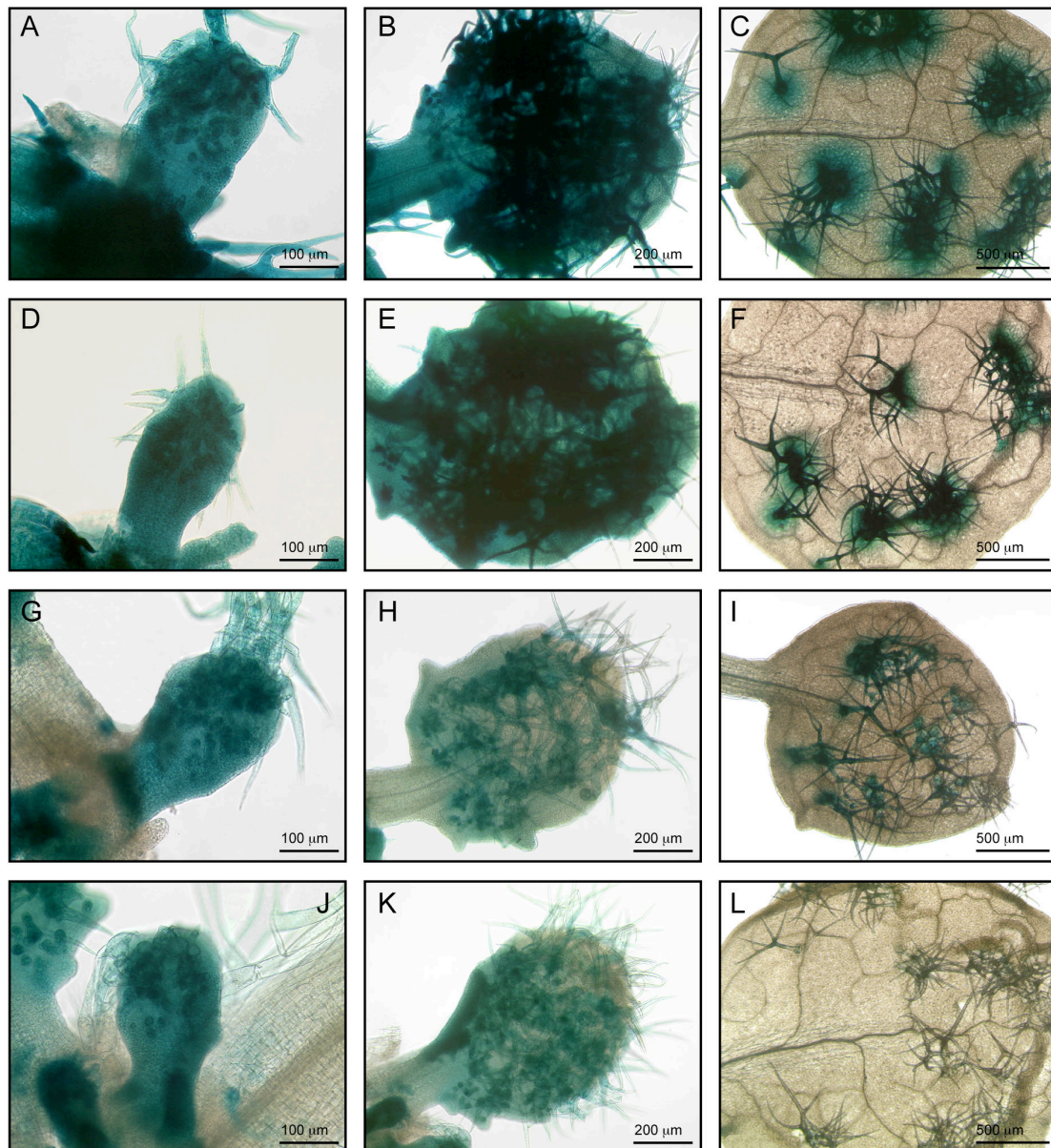


Abbildung 76: Expression der Konstrukte R81, R80, R32 und R82 in Rosettenblättern von *cpc try* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression des Gesamtpromotors (Pr16 mit Fragment-33) in dem Konstrukt R81 (A-C), des Promotorfragments Pr15 mit dem Fragment-33 in dem Konstrukt R80 (D-F), R32 (G-I) und des Promotorfragments Pr23 in dem Konstrukt R82 (J-L) in *cpc-1 try-82* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

Für die Pflanzen R82 *cpc try* (Pr23 + Fragment-33, Abb. 76J-L) ließ sich im Gegensatz zum Wildtyp ubiquitäre GUS-Expression in jungen, sich entwickelnden Blättern detektieren, die mit zunehmender Entwicklung der Blätter immer schwächer wurde. Die Expression war grundsätzlich schwächer als in den Pflanzen R80 *cpc try* und R81 *cpc try*. Im Gegensatz zum wildtypischen Hintergrund war die Trichomexpression in der Doppelmutante von Phase 1 bis 6 zu sehen. Im adulten Zustand (Abb. 76L) war allerdings im Gegensatz zu den Pflanzen R80 *cpc try* und R81 *cpc try* keine Expression mehr zu erkennen.

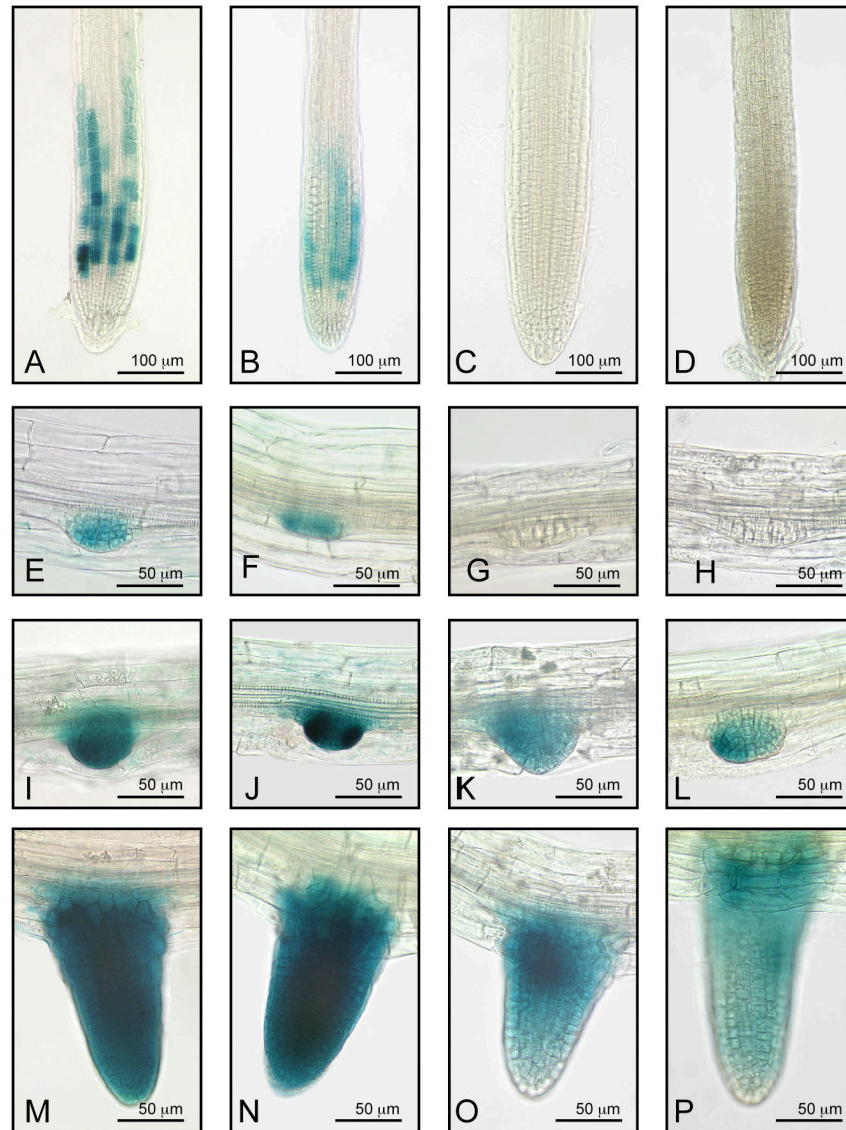


Abbildung 77: Expression der Konstrukte R81, R80, R32 und R82 in Primärwurzeln und Seitenwurzeln von *cpc try* Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression verschiedener *TRIPTYCHON*-Promotorfragmente in *cpc-1 try-82* Hintergrund: Pr16 mit Fragment-33 in dem Konstrukt R81 (A, E, I, M), Pr15 mit Fragment-33 in dem Konstrukt R80 (B, F, J, N), Pr16 in dem Konstrukt R32 (C, G, K, O) und Pr23 mit Fragment-33 in dem Konstrukt R82 (D, H, L, P). In A-D sind die Hauptwurzeln, in E-F die Primordien der Seitenwurzeln, in I-L junge Seitenwurzeln kurz nach der Initiation und in M-P auswachsende Seitenwurzeln dargestellt. Die Pflanzen wurden 24 Stunden GUS gefärbt, außer B und C, die nur 1 Stunde gefärbt wurden.

Im Kontrast zum wildtypischen Hintergrund ist in der *cpc-1 try-82* Doppelmutante *TRY*-Expression in der Wurzel zu detektieren (Schellmann *et al.*, 2002). Um zu klären, ob die Eingrenzung des *TRY*-Promotors auch diese Eigenschaft der Expression erfüllt, wurde die GUS-Expression in der Primärwurzel und in den Seitenwurzeln der entsprechenden Konstrukte in der Doppelmutante untersucht.

Das Konstrukt R83 (nur Fragment-33) zeigte keine Expression in der Wurzel der *cpc try* Pflanzen (ohne Abb.). In den Pflanzen R81 *cpc try* (Pr16 + Fragment-33) konnte die typische *cpc try* *TRY*-

Expression bereits nach einer Stunde GUS-Färbung detektiert werden (Abb. 77A). Dabei trat ein fleckenartiges Zufallsmuster von dem Ende der meristematischen Zone bis zur Elongationszone auf, d.h. bestimmte Zellen waren markiert, die aber nicht bestimmten Zellreihen zugeordnet werden konnten. In der *cpc try* Doppelmutanten sind zwar keine Wurzelhaare mehr vorhanden (Schellmann *et al.*, 2002), aber bisher ist unklar, zu welchem frühen Zellschicksal die Zellen determiniert wurden. Dasselbe Expressionsmuster fand sich auch in den Pflanzen R80 *cpc try* (Pr15 + Fragment-33, Abb. 77B). Im Gegensatz dazu wiesen die Pflanzen R32 *cpc try* (nur Pr16, Abb. 77C) auch nach 24 Stunden GUS-Färbung keine Expression in der Primärwurzel auf. Für die Pflanzen R82 *cpc try* (Pr23 + Fragment-33, Abb. 77D) konnte ebenfalls nach 24h Färbung keine GUS-Expression detektiert werden.

Erstaunlicher Weise konnte in den Seitenwurzeln von der Initiation bis zum Auswachsen GUS-Expression in den Pflanzen R81 *cpc try* und R80 *cpc try* beobachtet werden (Abb. 77E, I, M, F, J und N), wobei bisher kein Einfluss von *TRIPTYCHON* auf die Seitenwurzelbildung beschrieben wurde. Beim Auswachsen der Seitenwurzeln, aber nicht bei der Initiation, fand man auch in den Pflanzen R32 *cpc try* (Abb. 77G, K, O) und R82 *cpc try* GUS-Expression (Abb. 77H, L, P), die aber schwächer als mit den Konstrukten R80 und R81 war.

Eine Zusammenfassung der gewonnenen GUS-Expressionsdaten sowohl für das Rosettenblatt als auch für die Wurzel kann Abb. 78 entnommen werden.

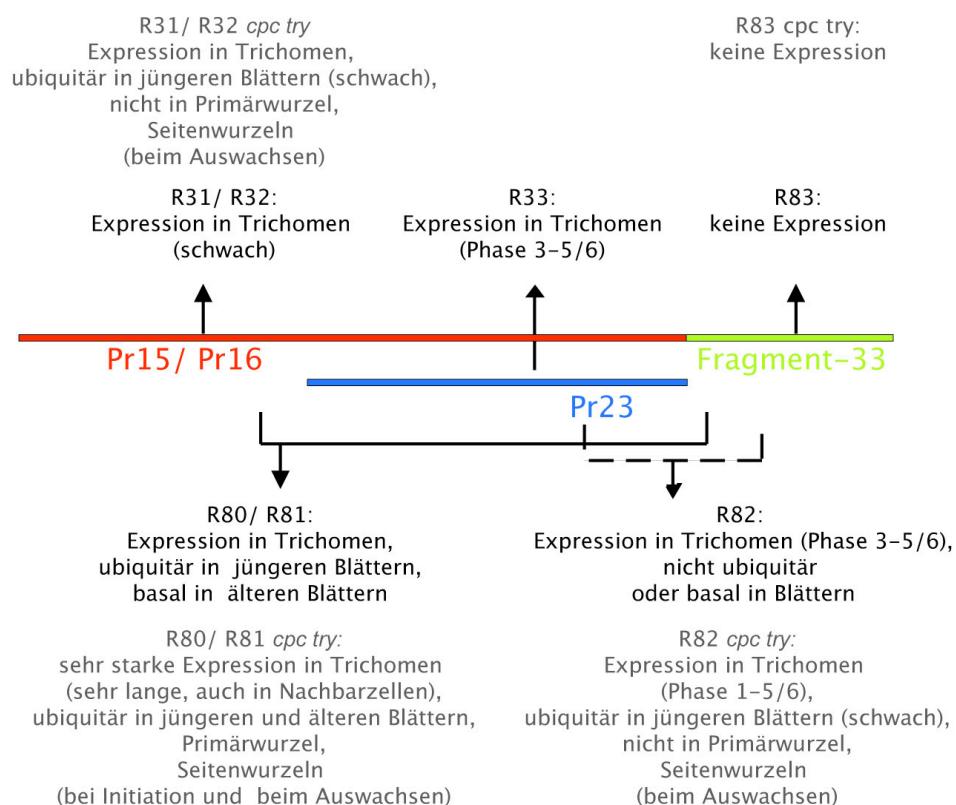


Abbildung 78: Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS-Analyse der TRY-Promotorfragmente in *Ler* und *cpc try* Hintergrund

2.5.4 Untersuchung der Rettungseffizienz des *TRY*-Promotors in *try* und *cpc try* Hintergrund

Neben den GUS-Expressionsanalysen des *TRY*-Promotors und der Promotorfragmenten Pr15 und Pr23 in Kombination mit Fragment-33 sollte ihre Kompetenz zur Trichom-Musterbildung und -verzweigung untersucht werden. Aus diesem Grunde wurden die Konstrukte R133, R134, R135 und R136 hergestellt, die die *TRY*-cDNA unter die transkriptionelle Kontrolle der *TRY*-Promotorfragmente Pr15, Pr16, Pr23 und Fragment-33 stellen und in die Funktionsverlust-Mutante *try-82* transformiert. In dieser Mutante sind 5-10% der Trichome in Nestern (Clustern) organisiert und die Verzweigungszahl der Trichome ist erhöht (Schellmann *et al.*, 2002).

Generell zeigte sich bei den Rettungsanalysen der *try-82* Mutante eine große Variationsbreite der T1-Pflanzen, so dass die Analyse nicht mit einigen, willkürlich gewählten T2-Pflanzen, sondern mit möglichst vielen T1-Pflanzen durchgeführt wurde. Da *try-82* eine sehr geringe Transformations-effizienz besitzt, musste sich die Untersuchung der Rettungseffizienz teilweise auf eine geringere Anzahl von T1-Pflanzen stützen. Es war leider auch nach mehrmaligen Versuchen nicht möglich, transgene Pflanzen des Konstrukts R134, das den Gesamtpromotor enthält, zu erzeugen.

Für *try-82* zeigten weniger als 10% T1-Pflanzen keine Cluster, während bei über 90% der Pflanzen 1-14,9% der Trichominitiationsstellen (TIS) als ein Cluster zu identifizieren war (Abb. 79). Im zu vergleichenden Wildtyp *Ler* besaßen über 90% der untersuchten Pflanzen keine Nester, und weniger als 10% der Pflanzen hatten nur 1-4,9% Clusteranteil an den TIS.

Die Pflanzen R133 *try-82* (Pr15 + Fragment-33), die in den entsprechenden Pflanzen R80 die charakteristische GUS-Expression lieferten, führten zu einer sehr guten Rettung (Abb. 79): Ca. 35% der T1-Pflanzen besaßen keine Cluster, während bei 42% der T1-Pflanzen bis zu 4,9% der TIS als Cluster, bei 15% bis zu 9,9% Clusteranteil und bei nur ca. 8% der T1-Pflanzen höhere Clusteranteile ausgebildet wurden. Für die Pflanzen R135 *try-82* (Pr23 + Fragment-33) und R136 *try-82* (nur Fragment-33) konnte keine Rettung festgestellt werden, da die Verteilung der Clusterhäufigkeit dem *try-82* Hintergrund entsprach.

Der Phänotyp der Funktionsverlust-Doppelmutante *cpc-1 try-82* zeigt aufgrund der redundanten Funktion der beiden Gene *TRY* und *CPC* einen sehr viel stärkeren Defekt in der Trichom-Musterbildung als die *try-82* Mutante, wie die Existenz von 95% der Trichominitiationsstellen als Cluster und die mittlere Clustergröße von 13,3 Trichome demonstriert (Kirik *et al.*, 2004a). Aus diesem Grund bietet dieser Hintergrund eine bessere Aufschlüsselung der Rettungseffizienz, da eine Reduktion der Clustergröße besser zu erkennen ist.

Die Konstrukte R133, R134 und R135 wurden in die Doppelmutante *cpc-1 try-82* eingebracht. Auch hier war die Transformationsrate gering, so dass sich die Rettungsuntersuchungen teilweise auf eine geringe Menge von T1-Pflanzen beschränken mussten. Das Konstrukt R134 führte auch in

diesem Hintergrund zu Problemen, so dass nur fünf Transformanten in mehreren Versuchen erzeugt werden konnten.

In der *cpc-1 try-82* Doppelmutante trugen alle Pflanzen Cluster (Abb. 80). Weniger als 10 % der Pflanzen besaßen 70-79,9% Clusteranteil an den TIS, mehr als 40% der Pflanzen 80-89,9% Clusteranteil, und 50% der Pflanzen wiesen 90-99,9% Clusteranteil auf. In *Ler* zeigten dagegen nur 10% der Pflanzen Cluster, dabei befand sich auf diesen Pflanzen ein maximaler Clusteranteil von bis zu 9,9% bezogen auf die TIS. Da die Doppelmutante *cpc-1 try-82* eine Kreuzung aus den beiden Ökotypen *Ler* und WS darstellt, war die Vergleichbarkeit mit *Ler* kritisch. Die Tatsache, dass WS keine Cluster trägt (Kirik *et al.*, 2004a), rechtfertigte *Ler* aber als Kontrolle für die maximale Clusterfrequenz im wildtypischen Zustand.

Die Pflanzen R133 *cpc try* und R134 *cpc try* führten zu einer guten Rettung, denn die Clusteranteile waren gegenüber der Doppelmutante zu kleineren Werten über den Bereich von 0,1 bis 49,9 % verschoben (Abb. 80). Die Rettung der Pflanzen R134 *cpc try* war geringfügig schlechter als mit dem Konstrukt R133, dies könnte allerdings auch an der geringen Menge von ausgewerteten Transformanten liegen. Erstaunlicher Weise zeigten die Pflanzen R135 *cpc try* im Gegensatz zu R135 *try* (vgl. Abb. 79) eine gemäßigte Rettung der Doppelmutante, da bei den meisten T1-Pflanzen 60-79,9% der TIS als Cluster ausgebildet waren, während nur noch ca. 15% der Pflanzen höhere Clusteranteile zeigten (Abb. 80).

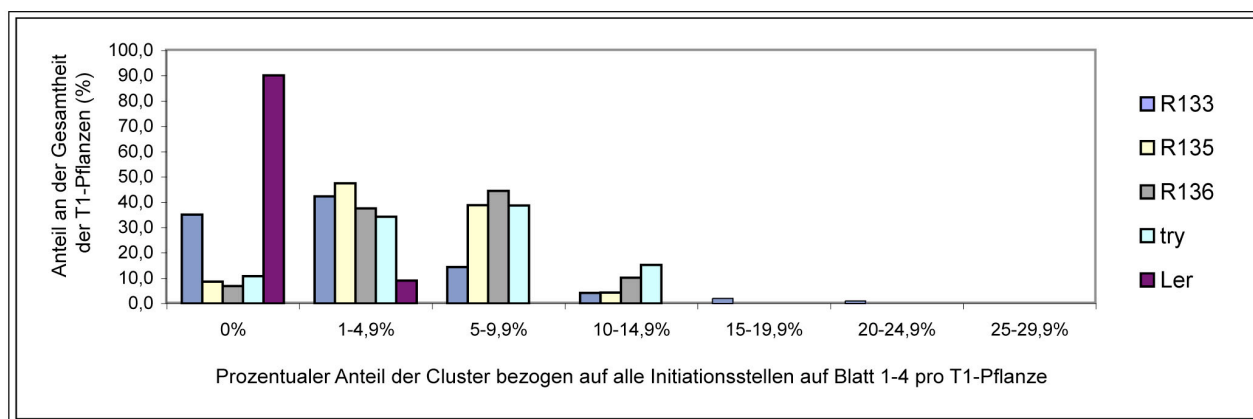


Abbildung 79: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R133, R135, R136 und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit bezogen auf die Gesamtzahl der Trichominitiationsstellen auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-4,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R133, R135, R136 in *try-82* Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try-82* zur Kontrolle (n = 96, 23, 29, 110, 110).

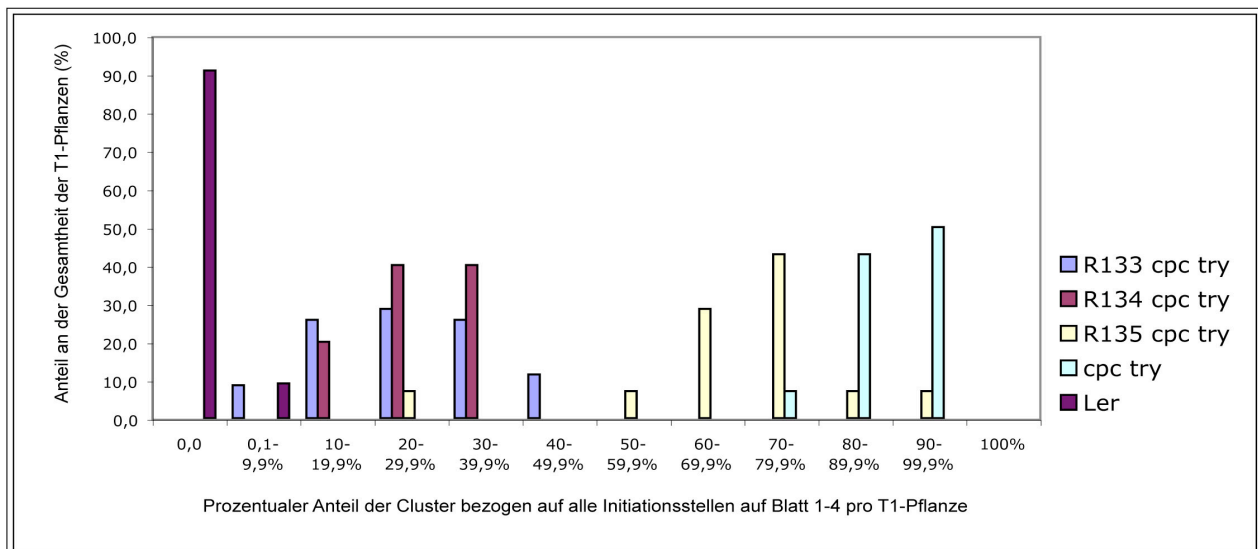


Abbildung 80: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen *cpc try* Pflanzen mit den Konstrukten R133, R134, R135 und *cpc try* sowie *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit bezogen auf die Gesamtzahl der Trichominisationsstellen auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-9,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R133, R134, R135 in *cpc-1 try-82* Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *cpc-1 try-82* zur Kontrolle (n = 35, 5, 14, 14, 20).

Nicht nur die Gesamtclusterhäufigkeit gibt Auskunft über die Rettungseffizienz, sondern auch die Trichomzusammensetzung der Cluster. Aus diesem Grunde wurden die Anteile der 3 Clustertypen (2 Trichome, 3 Trichome und mehr als 3 Trichome pro Cluster) bezogen auf die Gesamtheit der Cluster für die drei Konstrukte R133, R134 und R135 in der *cpc-1 try-82* Doppelmutante bestimmt (Abb. 81).

Der Clustertyp „2 Trichome pro Cluster“ war in der Doppelmutante *cpc-1 try-82* mit sehr geringen Anteilen von 0%-29,9% repräsentiert. Hingegen waren bei dem Wildtyp *Ler* 100% der Cluster von diesem Typ. Die Pflanzen R133 *cpc try* und R134 *cpc try* zeigten eine fast gleichmäßige Verteilung dieses Clustertyps über die T1-Pflanzen von 20-100% bezogen auf die Gesamtcluster. Hingegen fand man bei den Pflanzen R135 *cpc try* deutlich geringere Anteile dieses Clustertyps von 0,1-49,9%.

Für den Clustertyp „3 Trichome pro Cluster“ fand man grundsätzlich nur geringe Anteile von 0%-49,9% bezogen auf die Gesamtcluster bei allen untersuchten T1-Pflanzen, so dass dieser Typ wenig Aufschluss über die Rettungseffizienz lieferte. Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen der verschiedenen Konstrukte waren nicht zu erkennen.

Der Clustertyp „mehr als 3 Trichome pro Cluster“ war der bedeutendste Typ in der *cpc-1 try-82* Doppelmutante, denn der Anteil an den Gesamtclustern lag bei 70-99,9%. Für die Pflanzen R134 *cpc try* und R133 *cpc try* fand man deutlich geringere Anteile von 0-59,9% (mit einem Maximum

bei 0-19,9%). Die Anteile dieses Clustertyps für die Pflanzen R135 *cpc try* waren mit 30-89,9% geringer als bei der Doppelmutante, aber höher als bei den anderen beiden Konstrukten.

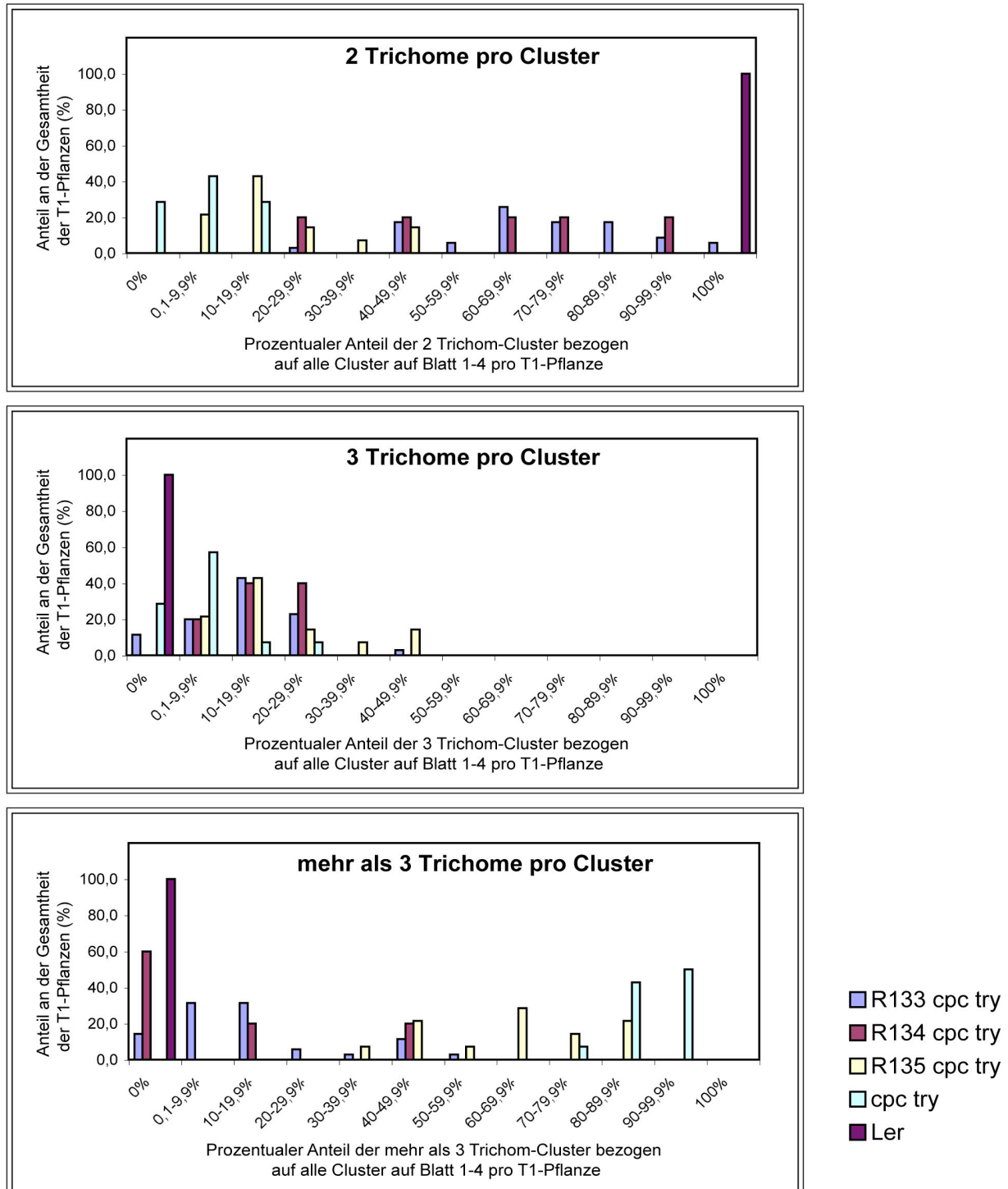


Abbildung 81: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Clusterkategorien (2 Trichome pro Cluster, 3 Trichome pro Cluster, mehr als 3 Trichome pro Cluster) der transgenen *cpc try* Pflanzen mit den Konstrukten R133, R134, R135 und *cpc try* sowie Ler zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit für die jeweilige Clusterkategorie bezogen auf die Gesamtzahl der Cluster auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-9,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R133, R134, R135 in *cpc-1 try-82* Hintergrund und die Hintergründe Ler und *cpc-1 try-82* zur Kontrolle (n = 35, 5, 14, 14, 20).

Die vergleichende Betrachtung von Rosettenblättern der Pflanzen R133 *cpc try*, R134 *cpc try*, R135 *cpc try* und der Doppelmutante *cpc try* (Abb. 82A-D) konnte die statistische Auswertung der Clusterfrequenzen und -größen bestätigen, da für R133 und R134 auch phänotypisch eine gute Rettung und für R135 nur eine Tendenz zur Rettung festgestellt werden konnte.

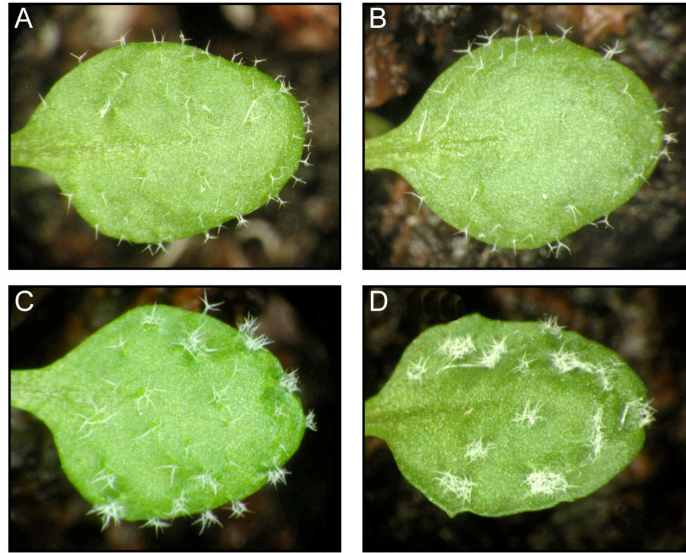


Abbildung 82: Phänotyp der Rettung der *cpc try* Doppelmutante durch die Konstrukte R133, R134 und R135 sowie von *cpc try*

Darstellung von Rosettenblättern der Rettung R133 *cpc-1 try-82* (A), R134 *cpc-1 try-82* (B), R135 *cpc-1 try-82* (C) sowie des zugehörigen Hintergrundes *cpc-1 try-82* (D).

Neben der Clusterbildung ist auch die Anzahl der Trichomäste in der Funktionsverlust-Mutante *try-82* betroffen: In der *try-82* Mutante konnten die meisten Trichome als 4- und 5-verzweigte Trichome charakterisiert werden (Abb.83): Die 4-verzweigten Trichome waren über eine Bandbreite des Anteils von 30-79,9% vertreten (mit einem Maximum von 50-59,9% auf). Die 5-verzweigten Trichome zeigten einen Anteil von 0,1-79,9% (mit einem Maximum von 20-29,9%). 3-verzweigte Trichome fand man nur zu einem Anteil von 0,1-49,9%, (mit einem Maximum von 10-19,9%). Bei dem Wildtyp *Ler* wurden hingegen die meisten Pflanzen als 3-verzweigte Trichome ausgebildet.

Die Pflanzen R133 *try-82* (Pr15 mit Fragment-33) zeigten einen klaren Anstieg des Anteils der 3-verzweigten Trichome gegenüber der *try* Mutante von 10%-100% bezogen auf die Gesamtzahl der Trichome (mit einem Maximum von 80-99,9%). Dadurch war der Anteil der 4- und 5-verzweigten Trichome gegenüber der Mutante deutlich reduziert. 4-verzweigte Trichome fand man über die Bandbreite des Anteils von 0-69,9% und 5-verzweigte Trichome nur noch bei der Hälfte der Pflanzen zum Anteil von 0-29,9%. Für die Pflanzen R135 *try-82* (Pr23 mit Fragment-33) und R136 *try-82* (nur Fragment-33) konnte dieselbe Verteilung der Trichomverzweigungen wie in der Mutante festgestellt werden, d.h. es trat keine Rettung der Trichomverzweigung auf.

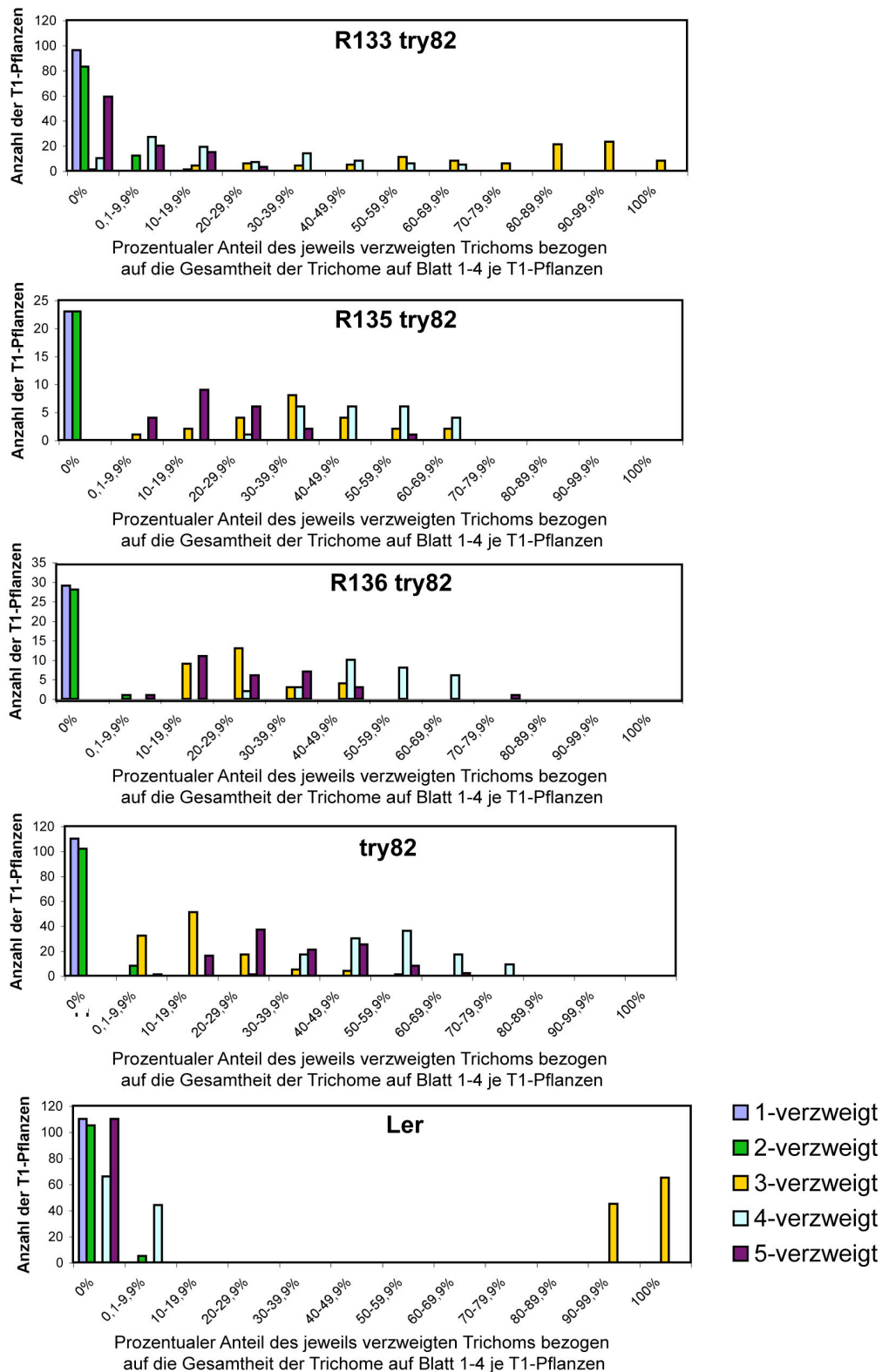


Abbildung 83: Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R133, R135, R136 und *try* sowie, *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze der Anteil des jeweils verzweigten Trichoms an der Gesamtzahl der Trichome auf Rosettenblatt 1-4 ermittelt (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 0,1-9,9% etc.). Anschließend wurde die Anzahl der Pflanzen bestimmt, die die jeweilige Häufigkeit der verschiedenen Verzweigungen aufweisen. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R133, R135, R136 in *try*-82 Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try*-82 zur Kontrolle (n = 96, 23, 29, 110, 110).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die Rettungsanalysen der *cpc try* Doppelmutante für die Musterbildung eine bessere Aufschlüsselung der Rettungstendenz lieferten als die der *try* Mutante. Die Rettungstendenz der Gesamtclusterhäufigkeit wurde in der Rettungseffizienz der Clusterzusammensetzung widerspiegelt. Die Konstrukte R133 (Pr15 mit Fragment-33) und R134 (Pr15 mit Fragment-33) zeigten bezüglich der Trichom-Musterbildung eine vergleichbar gute Rettung sowohl der *try-82* Mutante als auch der *cpc-1 try-82* Doppelmutante. Auch der Trichomverzweigungsphänotyp konnte gut gerettet werden. Die Konstrukte R135 (Pr23 + Fragment-33) und R136 (Fragment-33) zeigten in der *try-82* Mutante keine Rettung des Cluster- und Verzweigungsphänotyps. Für R135 konnte jedoch bei dem komplexeren Clusterphänotyp der *cpc-1 try-82* Doppelmutante erkannt werden, dass auch R135 eine gewisse Tendenz zu Rettung lieferte, da weniger und kleinere Cluster als in der Doppelmutante zu erkennen waren.

2.5.5 GUS-Expression der Deletionsfragmente des TRY-Promotorfragments Pr23

Um zu verstehen, welcher Bereich des Promotorfragments Pr23 die Expression in den Trichomen vermittelt, wurden weitere Deletionen durchgeführt (Abb. 84).

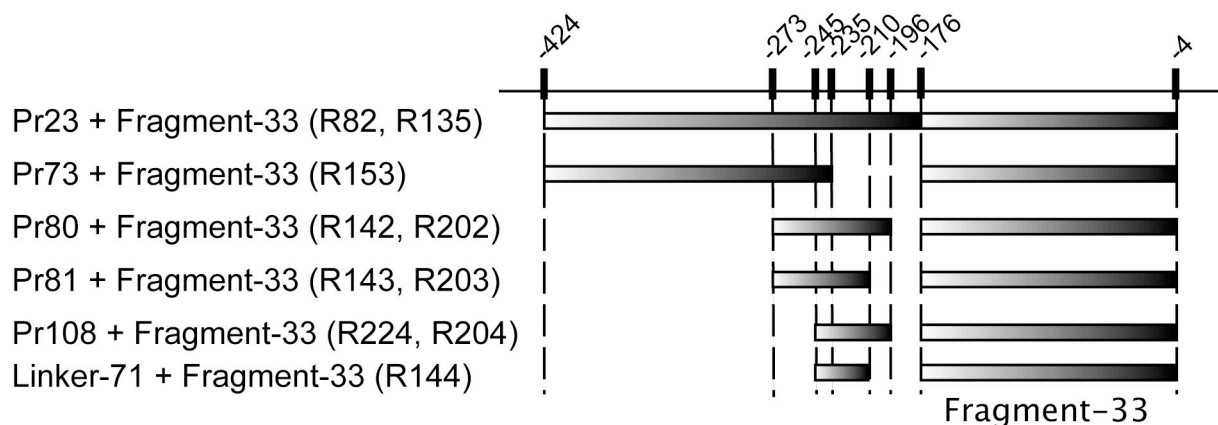


Abbildung 84: Deletionen der 5'-Promotorfragmente Pr15 und Pr23 von TRY

Deletionen des 5'-Promotorfragments Pr23 des *TRIPTYCHON*-Gens in den Entry-Vektoren Pr73, Pr80, Pr81 und Pr108 in Kombination mit dem Fragment-33. Nebstehend sind zum einen die zugehörigen GUS-Konstrukte R82, R153, R142, R143 und R224, sowie zum anderen die Rettungskonstrukte R135, R202, R203, R204, R144 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *TRIPTYCHON*.

Die Elimination eines größeren, proximalen Fragments in dem Promotorfragment Pr73 (-424 bis -235) in Kombination mit dem Fragment-33 führte zum völligen Verlust der GUS-Expression in Pflanzen R153 (ohne Abb.). Das Promotorfragment Pr80 (-273 bis -196) deckt diesen deletierten Bereich weitestgehend ab. In Kombination mit Fragment-33 vermittelte Pr80 in den Pflanzen R142 weiterhin Expression in den Trichomen (Abb.85A-C). Diese war aber schwächer als mit dem Fragment Pr23 (R82, vgl. Abb. 75G-I). Die zeitliche Regulation der Expression in den Trichomen, die für R82 bereits beschrieben wurde, blieb allerdings erhalten, da auch hier die Expression von

Phase 3- 5 (oder 6) der Trichomentwicklung zu detektieren war. Eine weitere Deletion zu dem Fragment Pr81 (-273 bis -210) führte zu einem völlig neuen Expressionsmuster in den Pflanzen R143. Hier war die GUS-Färbung sehr stark in den Petiolen ausgeprägt und breitete sich von hieraus über die Mittelrippe in den basalen Teil des Blattes aus (Abb. 85D-F). In älteren Blättern konnte in der mittleren Blattfläche schwache Expression detektiert werden (Abb. 85F). Expression in den Trichomen konnte nicht mehr festgestellt werden. Das Fragmente Pr108 (-245 bis -196) und das kleinste Fragment Linker-71 (-245 bis -211) lieferten in den Pflanzen R224 und R144 keine GUS-Expression in den Rosettenblättern (ohne Abb.).

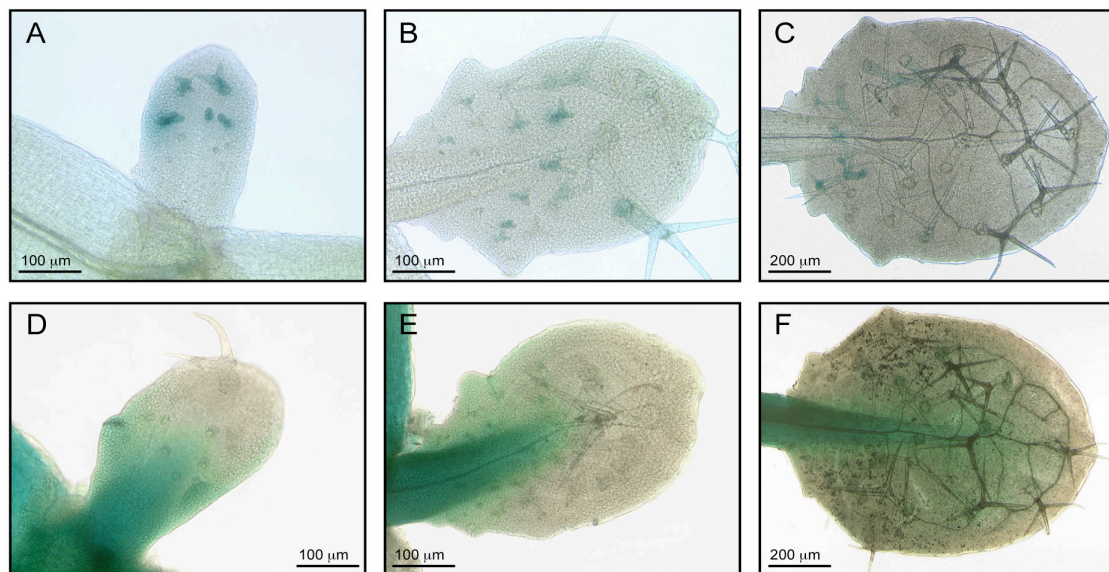


Abbildung 85: Expression der Konstrukte R142 und R143 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *TRIPTYCHON*-Gens Pr80 und Pr81 in Kombination mit dem Fragment-33 in den Konstrukten R142 (A-C) und R143 (D-F) in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

2.5.6 Untersuchung der Rettungseffizienz der deletierten Fragmente des *TRY*-Promotorfragments Pr23 in *try* und *cpc try* Hintergrund

Die Rettungskonstrukte R202, R203 und R204 enthalten die Promotorfragmente Pr80, Pr81 und Pr108 jeweils in Kombination mit dem Fragment-33 und vermitteln die Expression der *TRY*-cDNA. Die Pflanzen R202 *try*-82, R203 *try*-82 und R204 *try*-82 zeigten, wie die Pflanzen R135 *try*-82 (Pr23 mit Fragment-33), keine Rettung bezüglich der Clusterbildung und der Trichomverzweigung (ohne Abb.). Da die Pflanzen R135 *cpc-1 try*-82 eine Tendenz zur Rettung in der *cpc-1 try*-82 Doppelmutante aufwiesen (vgl. Abb. 80, 81, 82), wurden aus diesem Grund transgene *cpc-1 try*-82 Pflanzen mit den Konstrukten R202, R203 und R204 erzeugt.

Die Pflanzen R202 *cpc try* und R204 *cpc try* zeigten einen Anteil der Cluster an den TIS über den Bereich von 40-99,9%, und Unterschiede ließen sich kaum aufschlüsseln. Im Gegensatz dazu erstreckte sich die Clusterhäufigkeit der *cpc try* Doppelmutante über höhere Anteile von 70-99,9%

(Abb. 86). Die Pflanzen R203 *cpc try* zeigten gegenüber R202 *cpc try* und R204 *cpc try* eine Verschiebung zu höheren Clusteranteilen von 50-100%, die aber trotzdem geringer als bei der Doppelmutante waren.

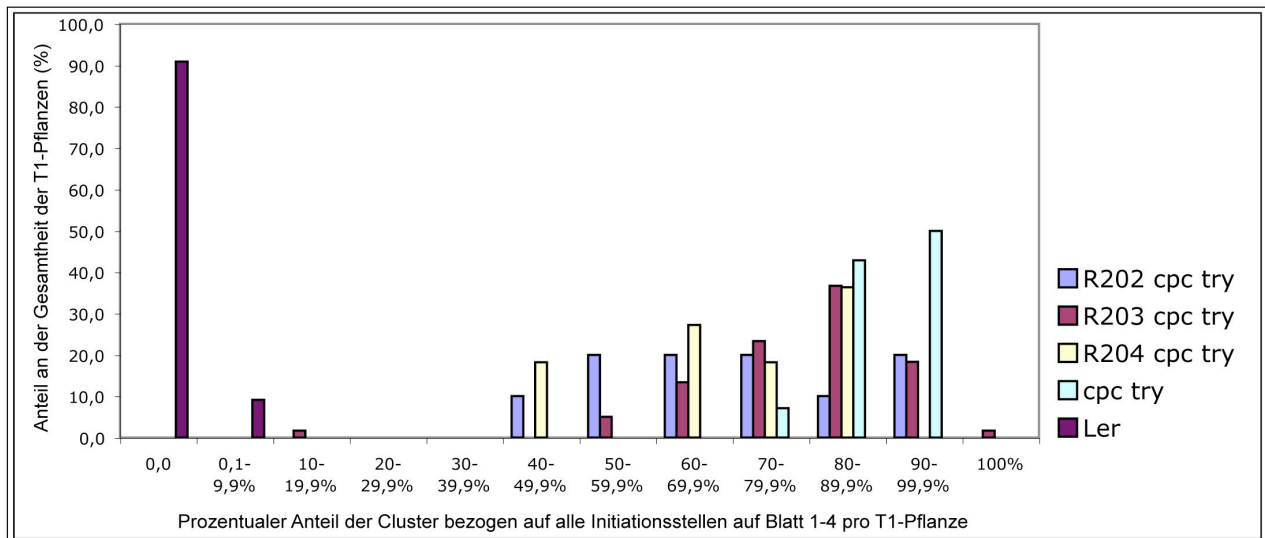


Abbildung 86: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen *cpc try* Pflanzen mit den Konstrukten R202, R203, R204 und *cpc try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit bezogen auf die Gesamtzahl der Trichominitiationsstellen auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-9,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R202, R203, R204 in *cpc-1 try-82* Hintergrund und der Hintergrund *Ler* und *cpc-1 try-82* zur Kontrolle (n = 10, 60, 11, 14, 20).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der GUS- und Rettungsanalysen für die Deletionsfragmente des 5'-TRY-Promotorfragments Pr23 kann der Abb. 87 entnommen werden.

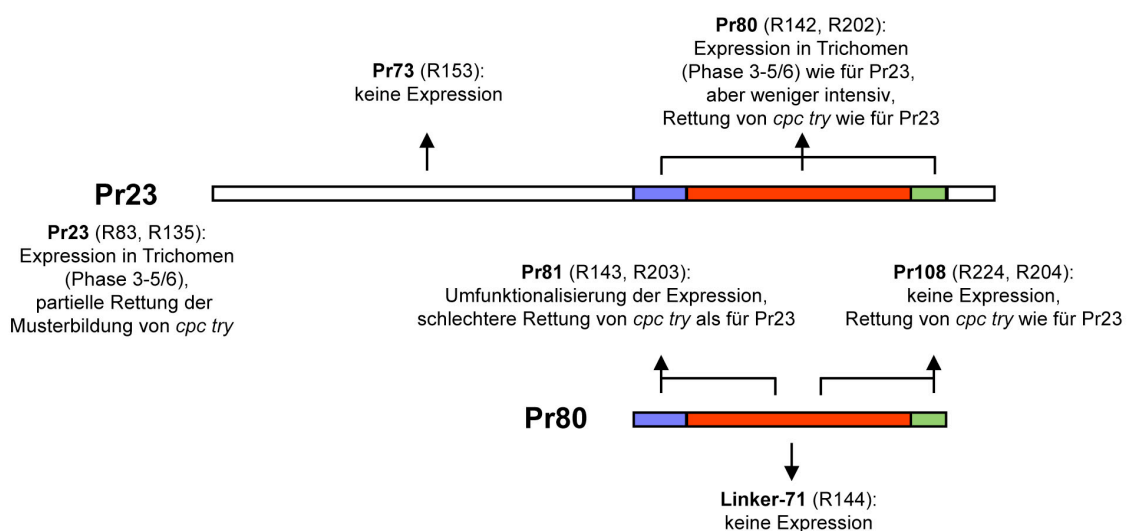


Abbildung 87: Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen des 5'-TRY-Fragments Pr23

In Farbe sind die einzelnen Bereiche dargestellt, die durch Deletionen des 5'-Promotorfragments Pr23 untersucht wurden. Den einzelnen Domänen wurden Funktionen für die Expression im Wildtyp und für die Rettung der *cpc try* Doppelmutante aufgrund der GUS- und Rettungsanalysen zugewiesen.

Da das kürzere Promotorfragment Pr15 in Kombination mit Fragment-33 die charakteristische *TRY*-Expression zeigte, wie die GUS-Analyse und die Rettungsversuche demonstrierten (s. 2.5.2 - 2.5.4), wurde die Analyse des *TRY*-Promotors in der PLACE-Datenbank nur mit der zugehörigen Sequenz von -623 bis -4 durchgeführt (Abb. 88).

Als Bindungsstelle für mögliche Faktoren des Aktivatorkomplexes der Musterbildung können die beiden MYB-Elemente (10, 11), die sich im distalen Bereich von Pr15 befinden, die beiden MYC-Elemente (12, 13) und die mögliche L1-Box (GL2-Bindungsstelle) innerhalb von Pr23, sowie die beiden W-Boxen am Ende von Pr80 (22, 6) und das SP8BFIBSP8BIB-Element (20) in Fragment-33 interessant sein. Des Weiteren fällt auf, dass hier einige Elemente im Zusammenhang mit GA-Regulation vorzufinden sind: AMYBOX1 (3), GAREAT/ MYBGAHV (7) und zwei PYRIMIDINEBOXHVEPB1 (16). Im Zusammenhang mit Lichtregulation können über den gesamten Bereich von Pr23 GT1CONSENSUS (8)-Elemente, sowie einmal das Element REALPHALGLHCB21 (19) identifiziert werden.



B

Nr.	Cis-Element	Sequenz	Bindender Faktor	Organismus	Gen/ Funktion
1	ABRELATERD1	ACGTG	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1, Trockenstress und Dunkelinduzierte Seneszenz
2	ACGTATERD1	ACGT	bZIP	Arabidopsis thaliana	ERD1
3	AMYBOX1	TAACARA		Hordeum vulgare, Oryza sativa, Triticum aestivum	alpha-Amylase
4	CAATBOX1	CAAT		Viele Eukaryoten	5'-Promotorregion, Heat Shock Proteine
5	CCAATBOX1	CCAAT			
5	DPBFCOREDCDC3	ACACNG	bZIP: DPBF1,2 ABI5	Daucus carota	DC3
6	ELRECOREPCRPI	TTGACC	WRKY1?	Arabidopsis thaliana Petroselinum crispum	PRI, Teil von W1 und W2, Elicitor Responsive Element
7	GAREAT	TAACAAR		Nicotiana tabacum	GA responsive Gene
7	MYBGAHV	TAACAAA		Arabidopsis thaliana	High pT alpha-Amylase
8	GT1CONSENSUS	GRWAAW	GT1-BF	Hordeum vulgare Pisum sativum Avena sativa	Licht-Regulation, SA-Induktion
9	MARTBOX	TTWTWTTWTT		Oryza sativa	
10	MYBPLANT	MACCWAMC	AmMYB308, AmMYB333	Nicotiana tabacum Arabidopsis thaliana Spinacia oleracea	„Scaffold Attachment Region“ Phenylpropanoid-Biosynthese Gene (PAL, CHS), Lignin Biosynthese Gene
11	MYBP2M	CCWACC	P-MYB	Zea mays	Phlobaphene Pigmentierung, Flavonoid Biosynthese
12	MYCATERD1	CATGTG	NAC	Arabidopsis thaliana	Dehydratisierung
12	MYCATRD22	CACATG	MYCATRD22		ABA-Induktion
13	MYCCONSUSAT	CANNTG	ATMYC2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
14	EBOXNAPA	CANNTG		Brassica napus	napA
14	NAPINMOTIFB	TACACAT		Brassica napus	Napin
15	PROLAMINBOXOSGLUB1	TGCAAAAG		Oryza sativa	GLUB1
16	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	TTTTTTCC		Hordeum vulgare	EPB-1, GA-Induktion
17	QELEMENTZMZM13	AGGTCA		Zea mays	ZM13, quantitatives Element
18	RAV1AAT	CAACA	RAV1	Arabidopsis thaliana	Element RAV1A in Kombination mit RAV1B In Rosettenblättern und Wurzel
19	REALPHALGLHCB21	AACCAA		Lemna gibba	Lhcb21
20	SP8BFIBSP8BIB	TACTATT	SP8BF	Ipomoea batatas	Sporamin, beta-Amylase
21	TBOXATGAPB	ACTTTG		Arabidopsis thaliana	GAPB (-94 bis -89, und -84 bis -79)
22	W-BOX	(T)(T)TGACY	WRKY		
22	WBOXATNPRI	TTGAC	WRKY	Arabidopsis thaliana	NPR1 (+70 und +79), SA-Induktion
22	WBOXNTERF3	TGACY	WRKY	Nicotiana tabacum	ERF3, Verwundung
22	WRKY71OS	TGAC	WRKY711	Oryza sativa	Amy32b, GA-Signaltransduktion
23	L1BOXATPDF1	TAAATGYA	AtML1	Arabidopsis thaliana	PDF1, L1-spezifische Expression (Abe <i>et al.</i> , 2001)
	Teil der „GL2-Box“	TAAATGTT	GL2	Arabidopsis thaliana	AtPLD ζ 1 (Ohashi <i>et al.</i> , 2003)

Abbildung 88: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente der 5'-Promotorfragmente Pr15 und Fragment-33 von TRY

In A ist die gesamte Sequenz des 5'-Promotors von -623 bis -4 bezogen auf den endogenen Translationsstart von TRY dargestellt. Die Nummern in **rot** geben die Zuweisung zu den in B aufgeführten interessanten cis-regulatorischen Elementen an. Sie befinden sich über den entsprechenden **rot** unterlegten Nukleotiden, die das jeweilige Element charakterisieren. Blau unterstrichen ist eine ähnliche Sequenz zur L1-Box bzw. zu einem Teil der GL2-Box. Die gebogenen Pfeile kennzeichnen den Anfang bzw. das Ende der Promotorfragmente, die jeweils daneben zu finden sind: Pr14, **Pr15**, **Pr23**, **Pr73**, **Pr80**, **Pr81**, **Pr108**, **Linker-71** und **Fragment-33**. In **türkis** ist der identifizierte Transkriptionsstart (Schellmann *et al.*, 2002) dargestellt.

In B sind die cis-regulatorischen Elemente mit zugehöriger Nukleotidsequenz, den bindenden Transkriptionsfaktoren (sofern bekannt), den Organismen, in den sie untersucht wurden, sowie das Gen, die Funktion bzw. der Stoffwechselweg, in dem sie identifiziert wurden, aufgelistet. Alle unwahrscheinlichen Elemente, wie z.B. PolyA-Signale, Pollen sowie *Agrobacterium* spezifische Elemente, vom Transkriptionsstart weit entfernte TATA- und CAAT-Boxen wurden nicht in die Liste aufgenommen. Außerdem wurden die Bindungsstellen, die durch nur 4 Nukleotide gekennzeichnet sind (DOFCORE, ARR1AAT, CACTFTPPCA1, GATA-Box), aufgrund ihrer Vielzahl außer Acht gelassen.

2.5.8 *TTG2- und GL2-abhängiges Transkriptionsmuster des TRY-Promotors*

Die Deletion von Pr80 zu Pr81 zeigte eine drastische Veränderung in der GUS-Expression. In dem deletierten Bereich wurde, wie die PLACE-Datenbank Analyse zeigte, eine W-Box in Nachbarschaft zu einer weiteren, vorgelagerten W-BOX identifiziert. Der WRKY-Transkriptionsfaktor TTG2 (TRANSPARENT TESTA GLABRA2) spielt in der Trichomdifferenzierung, aber auch in der Trichom-Musterbildung eine Rolle, wie die Funktionsverlust-Mutante *ttg2* zeigt. Zum einen bilden die Trichome in dieser Mutante weniger oder keine Verzweigungen aus, und zum anderen ist die Trichomanzahl reduziert und die Clusterfrequenz erhöht (Johnson *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde die GUS-Expression des Gesamtpromotors von *TRY* mit dem Konstrukt R81 (Pr16 + Fragment-33) in der *ttg2-1* Funktionsverlust-Mutante untersucht. Hierbei konnte GUS-Expression in den jungen Blättern (Abb. 89A) und in den Petiolen älterer Blätter festgestellt werden (Abb. 89B, C). In den Trichomen, die in dieser Mutante nur kleine Auswüchse darstellen, war keine GUS-Expression zu detektieren (Abb. 89B, C). Damit entsprach diese Expression der in den Pflanzen R143 (Pr81 + Fragment-33, vgl. Abb. 85D-F).

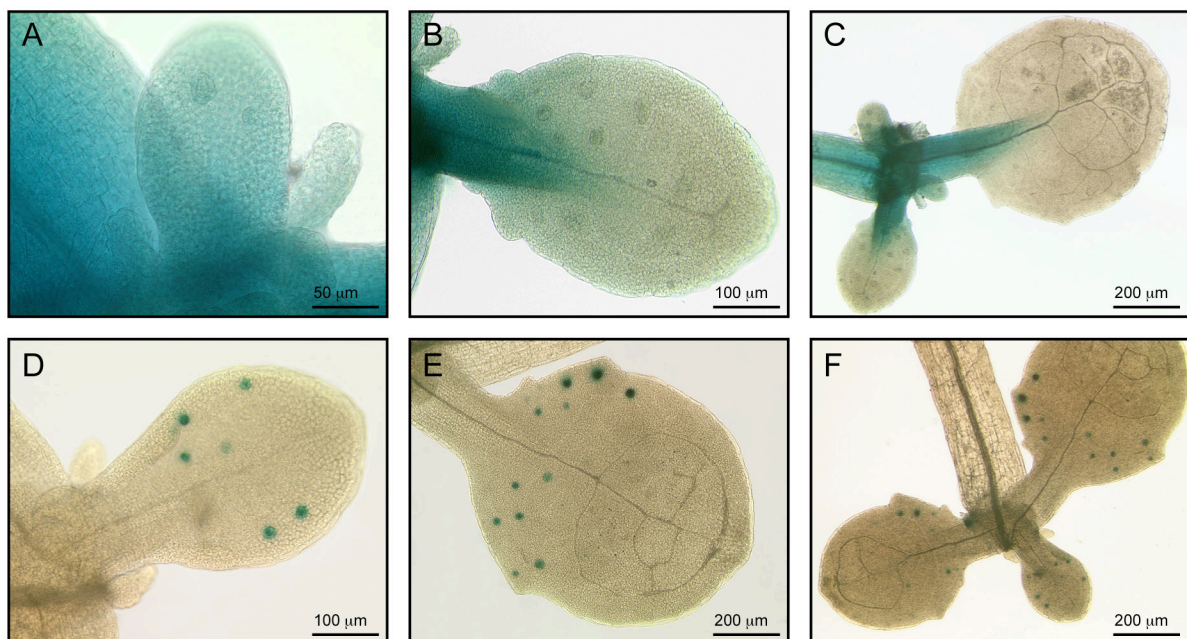


Abbildung 89: Expression der Konstrukte R82 bzw. TRY::GUS in Rosettenblättern von *ttg2*- und *gl2*-Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Gesamtpromotors des *TRIPTYCHON*-Gens in den Linien R81 *ttg2-1* (A-C) und TRY::GUS (Schellmann *et al.*, 2002) *gl2(YI)* (D-F) nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

Die *gl2* Funktionsverlust-Mutante zeigt einen ähnlichen Trichomphänotyp wie *ttg2*, d.h. auch hier ist die Trichomdifferenzierung reduziert (Johnson *et al.*, 2002). Ebenso wurde ein synergistischer Effekt der beiden Mutanten *gl2* und *ttg2* festgestellt (Johnson *et al.*, 2002). Die Deletion von Pr23

zu Pr80 führte zu einer Reduktion der Trichomexpressionsstärke der Pflanzen R142. In dem deletierten Bereich konnte unter anderem eine Variante der L1-Box (Abe *et al.*, 2001) bzw. ein Teil der GL2-Box (Ohashi *et al.*, 2002) lokalisiert werden (vgl. Abb. 88). Aufgrund dieser Fakten sollte der Einfluss von GL2 auf die *TRY*-Expression untersucht werden. GUS-Expression von *TRY* in *gl2(YI)* Funktionsverlust-Mutanten zeigten ein völlig anderes Expressionsmuster als *ttg2* Mutanten. Hier detektierte man nur noch GUS-Expression in jungen Trichomen, die sich am Rand und in der basalen Zone der Blätter befinden. Die ubiquitäre Färbung der Blätter und die Färbung in älteren Trichomen war völlig verschwunden (Abb. 89D-F).

TTG2 und GL2 hatten folglich beide einen Effekt auf die *TRY*-Expression, unterschieden sich aber deutlich in der Lokalität und den Zeitraum ihrer Wirkung: Die Trichomexpression ist TTG2-abhängig und die ubiquitäre Expression hängt von GL2 ab.

2.5.9 GA-abhängiges Transkriptionsmuster des *TRY*-Promotors

Das 5'-Promotorfragment Pr15 wies im distalen Bereich zwei cis-regulatorische Elemente (GAREAT und PYRIMIDINEBOX) auf, die im Zusammenhang mit der Gibberellinsäure-Regulation stehen (vgl. Abb. 88, Ogawa *et al.*, 2003; Cercos *et al.*, 1999). Die PYRIMIDINEBOX konnte auch in dem proximalen Fragment-33 lokalisiert werden. Aus diesem Grund wurde die GA-Abhängigkeit der *TRY*-Expression untersucht.

Die GUS-Expression konnte in den Trichomen detektiert werden, die sich trotz Paclobutrazol-Zugabe ausbilden konnten. Die Färbung in den zu den Trichomen benachbarten Zellen wurde nicht mehr beobachtet. Die ubiquitäre Expression war in älteren Blättern völlig verschwunden, und war in jungen Blättern weniger stark (vgl. Abb. 90A und 90B). Folglich war die Expressionsstärke gegenüber dem Paclobutrazol freien Medium verringert.

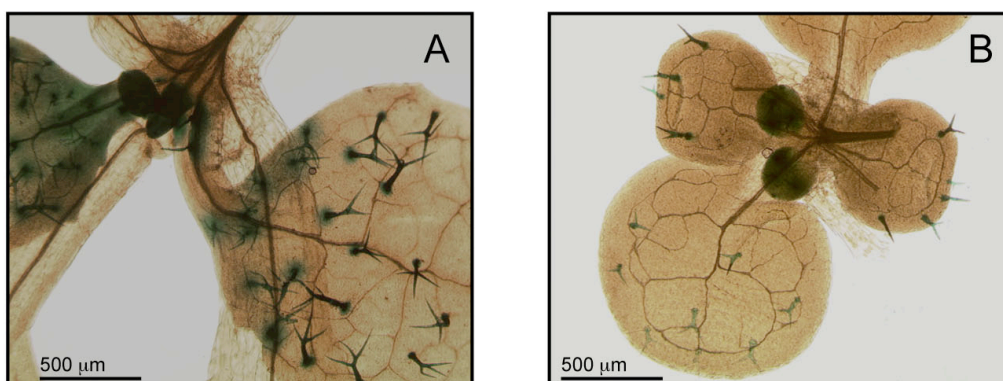


Abbildung 90: *TRY*-Expression in Rosettenblättern nach Wachstum auf Paclobutrazol

Lokalisierung der GUS-Expression von 5'-*TRY*::GUS-pAMPAT in *Ler* Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. In A sind 18 Tage alte Pflanzen von MSAR-Platte ohne Paclobutrazol und in B entsprechenden mit 10^{-6} M Paclobutrazol dargestellt.

2.5.10 Regulation der TRY-Expression durch Faktoren der Trichom-Musterbildung

Als mögliche Faktoren, die die *TRIPTYCHON*-Expression regulieren, könnten die bereits identifizierten Regulatoren der Trichom- bzw. Wurzelhaar-Musterbildung eine Rolle spielen.

Um dies zu überprüfen, wurden Kombinationen der Aktivatoren (*GL1*, *GL2*, *GL3*, *TTG1*, *TTG2*) und des Inhibitors (*TRY*) ektopisch in pTRY::GUS Pflanzen exprimiert. Dazu wurden die Kotyledonen und teilweise ältere Blätter der pTRY::GUS Pflanzen mit den Konstrukten, in denen das jeweilige Musterbildungsgen unter der Kontrolle des 35S-Blumenkohl-Mosaikvirus gestellt ist, durch Partikelbeschuss transformiert (s. Tab. 14).

Tabelle 14: Übersicht der verschiedenen Kombinationen transient transformierter 35S-Konstrukte von Pflanzen mit TRY::GUS-, R80, R81 und R82

Die jeweilige Konstruktkombination wurde auf die Kotyledonen, bzw. die ersten beiden, adulten Rosettenblätter bombardiert. Die stabil transformierten Pflanzen pTRY::GUS Ler, R80 Ler, R81 Ler, R82 Ler und TRY::GUS *gl2(YI)* wurden für den Partikelbeschuss benutzt. Das Ergebnis der GUS-Färbung mit besonderen Merkmalen ist nebenstehend aufgelistet. Die Zeichen können wie folgt interpretiert werden: ++ sehr stark, + stark, (+) ganz schwach und selten.

Transformierte 35S::Konstrukte	GUS-Expression	Besondere Merkmale
TRY::GUS/ Kotyledonen in Ler		
GL1, GL2, GL3, TTG1	++	Sehr stark in der Epidermis, Mesophyll
GL1, GL2, GL3	++	Sehr stark in der Epidermis, Mesophyll
GL1, GL2, TTG1	-	
GL1, GL3, TTG1	+	Mittel stark in der Epidermis, Mesophyll
GL1, GL2	-	
GL1, GL3	(+)	1 Zelle sehr schwach in der Epidermis bzw. im Mesophyll?
GL1, TTG1	(+)	1 Zelle sehr schwach in der Epidermis bzw. im Mesophyll?
GL1	-	
GL2, GL3, TTG1	++	1 Zelle im Mesophyll
	+	1 Zelle schwach in der Epidermis
GL2, GL3	-	
GL2, TTG1	-	
GL2	-	
GL3, TTG1	-	
GL3	-	
GL1, GL3, TTG1, TTG2	++	Sehr stark in der Epidermis, Mesophyll
GL1, GL2, GL3, TTG1, TRY	-	
GL1, GL2, GL3, TRY	+	2 Zelle schwach im Mesophyll
TRY::GUS/ 1. Blattpaar in Ler		
GL1, GL3, TTG1	++	Mittel stark in der Epidermis
GL1, GL3, TTG1, GL2	++	Sehr stark in der Epidermis
R80 (Pr15 + Fragment-33)/ Kotyledonen in Ler		
GL1, GL3, TTG1	+	Mittel stark in der Epidermis
GL1, GL3, TTG1, TTG2	++	Sehr stark in der Epidermis
GL1, GL3, TTG1, GL2	++	Sehr stark in der Epidermis
R82 (Pr23 + Fragment-33)/ Kotyledonen in Ler		
GL1, GL3, TTG1	-	
GL1, GL3, TTG1, TTG2	+	1 Zelle schwach in der Epidermis
GL1, GL3, TTG1, GL2	-	
TRY::GUS/ Kotyledonen in gl2		
GL1, GL3, TTG1, TTG2	++	Sehr stark in der Epidermis
GL1, GL3, TTG1, GL2	++	Sehr stark in der Epidermis

Die Kombination der 35S-Expressionskonstrukte der Gene *GL1*, *GL3* und *TTG1* führte bei dem Partikelbeschuss zu einer ektopischen Aktivierung der *TRY*-Expression sowohl in den Epidermiszellen der Kotyledonen als auch der Epidermiszellen älterer Blätter (Abb. 91D, L). Die Expression konnte durch Zugabe von *GL2* verstärkt werden, dies konnte sowohl in den Kotyledonen als auch in den Rosettenblättern gezeigt werden (Abb. 91A, J, K). Dabei war die Zugabe von *TTG1* unerheblich, da sich auch für den Beschuss von *GL1*, *GL2*, *GL3* die gleiche, starke Expression zeigte (Abb. 91B). Eine Verstärkung der Expression konnte auch beobachtet werden, wenn zusammen mit den Komponenten *GL1*, *GL3*, *TTG1* auch *TTG2* geschossen wurde (Abb. 91C) (Tab. 14).

In wenigen Fällen konnte eine sehr schwache Aktivierung erfolgen, wenn *GL1* mit *GL3* (Abb. 91E), *GL1* mit *TTG1* (Abb. 91F) und *GL2* mit *GL3* und *TTG1* (Abb. 91G) transient transformiert wurde. In allen anderen Kombinationen der aktivierenden Faktoren oder der einzelnen Faktoren (s. Tab. 14) konnte keine ektopische GUS-Expression detektiert werden.

Die Zugabe des Inhibitors *TRY* zu der Kombination *GL1*, *GL2*, *GL3*, *TTG1* und *GL1*, *GL2*, *GL3* führte zum Verlust der Aktivierung des *TRY*-Promotors (s. Tab. 14). Nur in jeweils einer Zelle konnte unter einer Vielzahl von GFP markierten Epidermiszellen der Kotyledonen (Abb. 91H, I) jeweils GUS-Expression festgestellt werden, die möglicher Weise auf Konzentrationsunterschiede des TRY-Proteins zurückzuführen ist.

Für pTRY::GUS in der *gl2(YI)* Funktionsverlust-Mutante konnte starke Aktivierung sowohl durch *GL1*, *GL3*, *TTG1* mit *GL2* als auch mit *TTG2* erzielt werden (Tab. 14).

Neben dem Gesamtpromotor von *TRY* sollten auch die kürzeren Fragmente Pr15 und Pr23 jeweils in Kombination mit dem Fragment-33 in ihrer Fähigkeit zur Aktivierung der *TRY*-Expression getestet werden. Für die Pflanzen R80 (Pr15 + Fragment-33) konnte, wie für pTRY::GUS, eine Aktivierung durch *GL1*, *GL3* und *TTG1* in den Keimblättern der entsprechenden Pflanzen erfolgen, die durch die Zugabe von *GL2* oder *TTG2* verstärkt werden konnte (Tab. 14). Womit diese Pr15 mit Fragment-33 auch hier die gesamte Information wie der Gesamtpromotor beinhaltet.

Die Expression in den Kotyledonen der Pflanzen R82 konnte kaum aktiviert werden. Nur die Zugabe von *TTG2* zu den Komponenten *GL1*, *GL3* und *TTG1* ermöglichte in einer Epidermiszelle eine schwache GUS-Expression (Tab. 14).

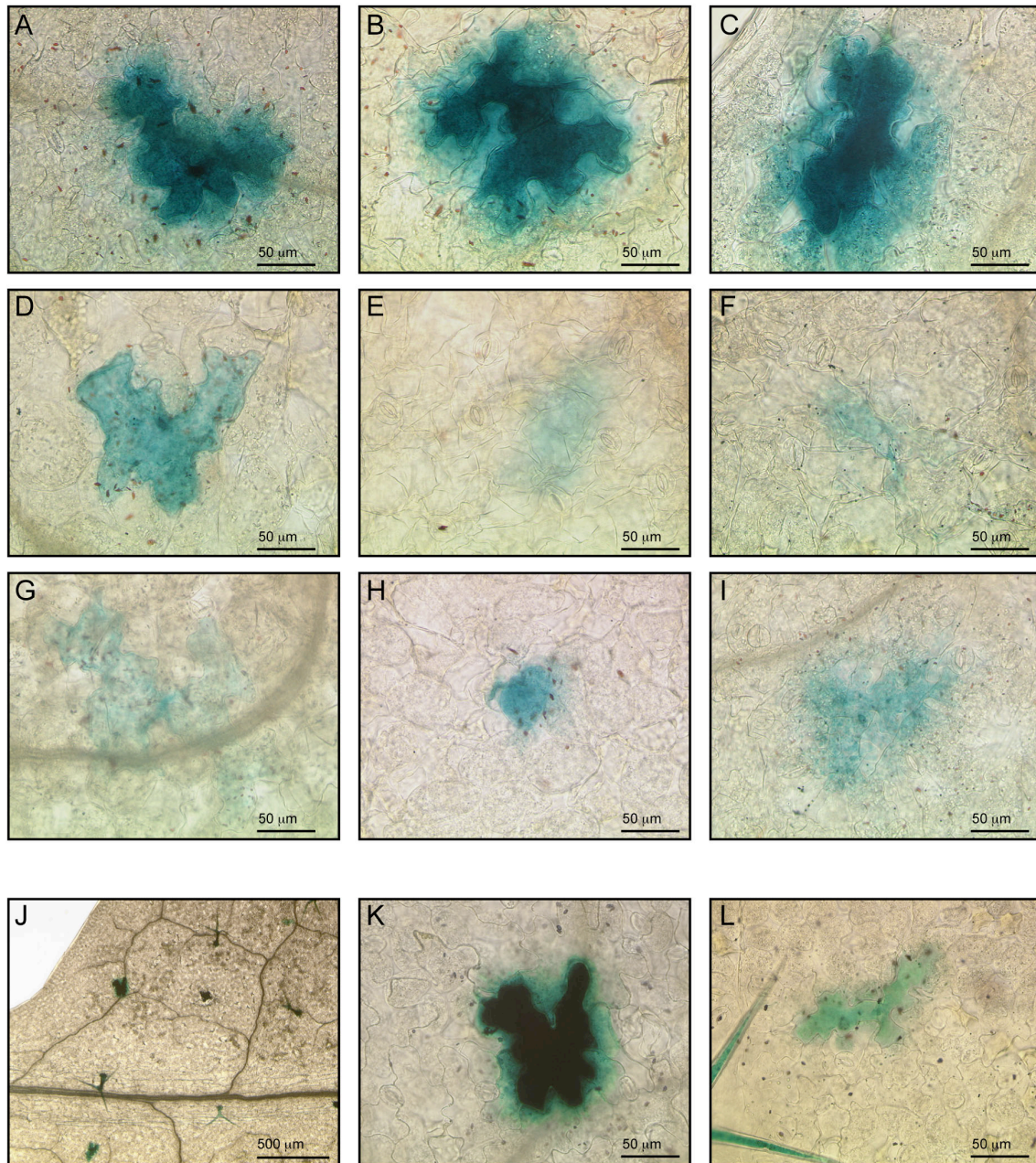


Abbildung 91: Expression in einzelnen Epidermiszellen nach Partikelbeschuss von TRY::GUS Pflanzen

GUS-Expression nach 24 Stunden Färbung in durch Partikelbeschuss transient transformierten Epidermiszellen der pTRY::GUS Ler Pflanzen (A-I Kotyledonen nach 7 Tagen, J-L erstes Rosettenblattpaar nach 14 Tagen). Folgende Kombinationen der 35S-Konstrukte wurden mit 35S::GFP bombardiert: **A)** GL1, GL2, GL3, TTG; **B)** GL1, GL2, GL3; **C)** GL1, GL3, TTG1, TTG2; **D)** GL1, GL3, TTG1; **E)** GL1, GL3, **F)** GL1, TTG1; **G)** GL2, GL3, TTG1; **H)** GL1, GL2, GL3, TTG1, TRY; **I)** GL1, GL2, GL3, TRY; **J)** GL1, GL2, GL3, TTG; **K)** GL1, GL2, GL3, TTG; **L)** GL1, GL3, TTG.

2.5.11 Rettung des *try*-Hintergrunds mit der *TRY*-cDNA unter der Regulation unterschiedlicher Promotoren

Das GUS-Expressionsmuster des *TRY*-Promotors im Rosettenblatt zeigte Ähnlichkeit zu dem Expressionsmuster anderer Musterbildungsgene. Ob die regulatorische Information dieser Gene auch in der Lage ist, wenn sie die Expression der *TRY*-cDNA vermittelt, die Rettung der Funktionsverlustmutante *try*-82 (Musterbildung und Verzweigung) zu ermöglichen, sollte überprüft werden. Aus diesem Grund wurde exemplarisch zum einen der 3'-Enhancer von *GLABRA1* und zum anderen der *CAPRICE* Gesamtpromotor und ein Minimalfragment (s. 2.6.1) mit dem 35S-Minimalpromotor vor die *TRY*-cDNA fusioniert (s. Tab. 15), und in *try*-82-Pflanzen transformiert.

Tabelle 15: Kombination der Promotorfragmente mit der *TRY*-cDNA in den zugehörigen Konstrukten zur Rettung der *try* Mutante

Auflistung der verschiedenen Rettungskonstrukte mit der *TRY*-cDNA und den unterschiedlichen Promotoren

Promotor	Fragment	Konstrukt
pGL1	3'-GL1	R137
pGL1	3'-GL1 + Fragment-33 (TRY)	R138
pCPC	Pr17	R156
pCPC	Pr24	R157
pCPC	Pr17 + Fragment-33 (TRY)	R158
pCPC	Pr24 + Fragment-33 (TRY)	R159

Im zu vergleichenden Hintergrund *try*-82 betrug der Anteil der Cluster 1-14,9% bei 90% der Pflanzen (Abb. 92, 93).

Die Pflanzen R137 *try*-82 und R138 *try*-82, die den 3'-Enhancer von *GLI* als regulatorische Information tragen, wiesen eine gute Rettung des Cluster-Phänotyps auf (Abb. 92). Das Konstrukt R137 vermittelte in 90% der Pflanzen, dass keine Cluster mehr gebildet wurden, und die restlichen 10% der T1-Pflanzen zeigten nur noch bis zu 9,9% Cluster. Das Konstrukt R138, das den 3'-*GLI*-Enhancer in Kombination mit dem proximalen Fragment-33 des *TRY*-Promotors trägt, rettete etwas schlechter als R137. Über 45% der Pflanzen zeigten keine Cluster, und weitere 45% der Pflanzen wiesen einen Clusteranteil bis zu 9,9% auf. Zwei Pflanzen besaßen sehr hohe Clusteranteile, die jedoch nicht in das Bild der Rettung der anderen Pflanzen mit diesem Konstrukt passen.

Die Pflanzen R156 *try*-82 und R157 *try*-82, bei denen das kleine *CPC*-Promotorfragment Pr17 bzw. der gesamte *CPC*-Promotor Pr24 als regulatorische Information für die *TRY*-Expression dient, zeigten eine gute Rettung der Clusterinitiation (Abb. 93). Ca. 60% der T1-Pflanzen hatten keine Cluster, mehr als 20% der T1-Pflanzen besaßen einen Clusteranteil von 1-4,9%, ca. 10% der T1-Pflanzen hatten einen Anteil von 5-9,9% Cluster, und in weniger als 5% der T1-Pflanzen konnte ein Clusteranteil von bis zu 14,9% festgestellt werden. Damit wurden deutlich weniger Cluster ausgebildet, als in der *try* Mutante.

Die Pflanzen R158 *try*-82 und R159 *try*-82 (Pr17 bzw. Pr24 mit Fragment-33) konnten durch eine noch bessere Rettung der Clusterfrequenz charakterisiert werden, da sie keine Cluster mehr aufwiesen (Abb. 93). Außerdem fanden sich in den Pflanzen R158 *try*-82 und R159 *try*-82 deutlich weniger Trichome auf den ersten vier Rosettenblättern als in der *try* Mutante und in dem entsprechenden Wildtyp *Ler* (Abb. 94). Bei den Pflanzen R156 *try*-82 und R157 *try*-82 war die Trichomzahl hingegen nicht verändert (ohne Abb.).

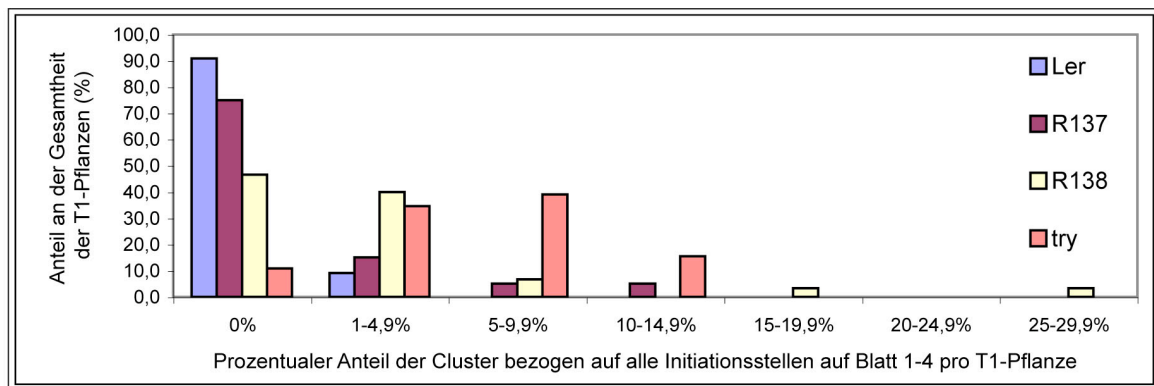


Abbildung 92: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R137, R138, die den 3'-Enhancer von *GL1* tragen, und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit bezogen auf die Gesamtzahl der Trichominitiationsstellen auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-4,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R137, R138 in *try*-82 Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try*-82 zur Kontrolle (n =20, 30, 110, 110).

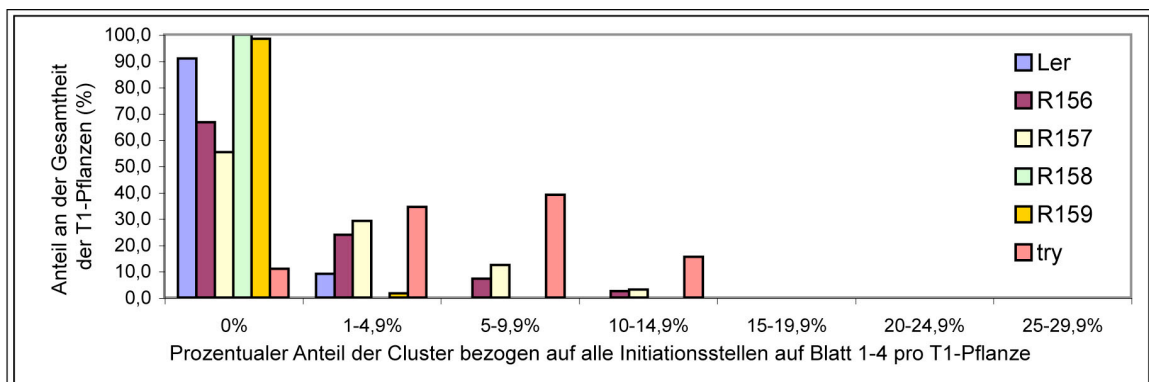


Abbildung 93: Darstellung des prozentualen Anteils der jeweiligen Gesamtclusterhäufigkeit der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R156, R157, R158, R159, die die regulatorische Information von *CPC* tragen, und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Dabei wurde für jede einzelne T1-Pflanze die Clusterhäufigkeit bezogen auf die Gesamtzahl der Trichominitiationsstellen auf Rosettenblatt1-4 ermittelt. (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 1-4,9% etc.) Anschließend wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Clusterhäufigkeit über die Gesamtheit der T1-Pflanzen bestimmt. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R156, R157, R158 und R159 in *try*-82 Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try*-82 zur Kontrolle (n =42, 65, 10, 62, 110, 110).

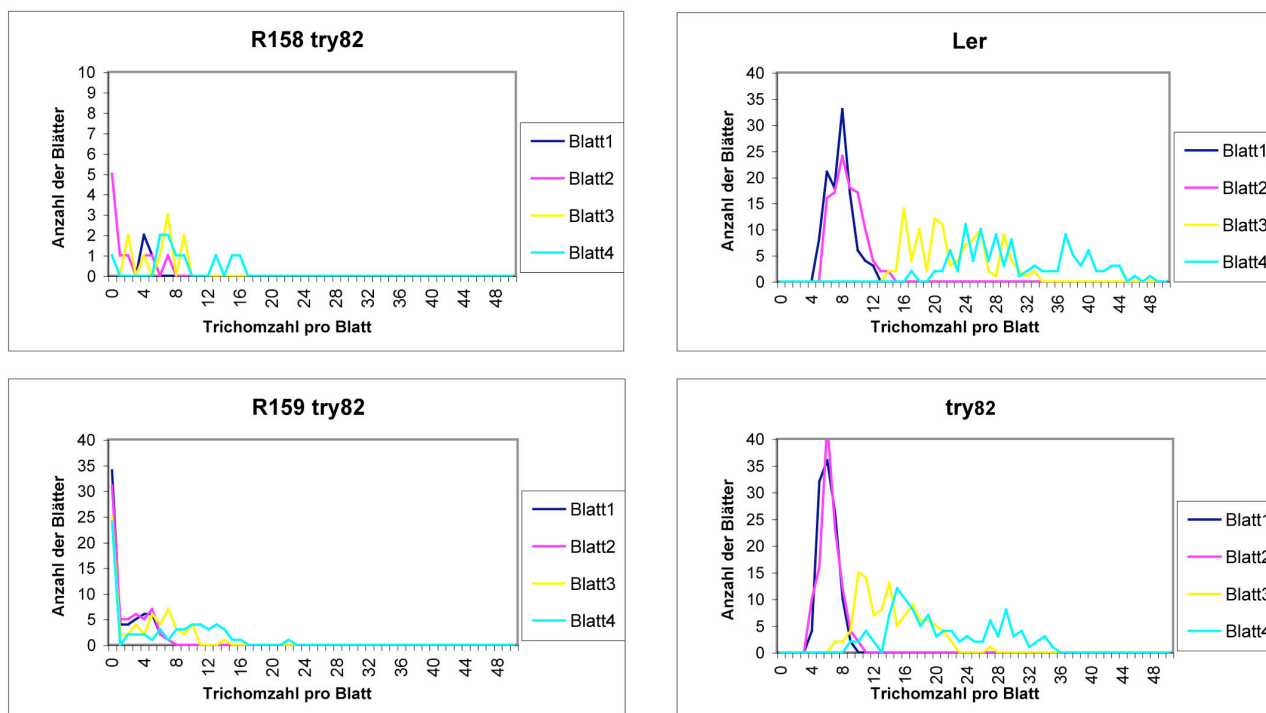


Abbildung 94: Darstellung der Trichomzahlen der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R158, R159 und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Darstellung der Trichomzahlen der Konstrukte R158 *try*-82 und R159 in *try*-82 Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try*-82. Dabei wurde die Anzahl der Blätter der Kategorie Rosettenblatt 1, 2, 3, oder 4 in Abhängigkeit von der Trichomzahl bestimmt. Untersucht wurde die erste Generation nach der Transformation (n= 10, 62, 110, 110).

Die Pflanzen R137 *try*-82 und R138 *try*-82 (3'-Enhancer von *GL1* ohne bzw. mit dem Fragment-33 von *TRY*) wiesen keine Rettung der Verzweigungszahl auf (Abb. 95), da viele 4-verzweigte Trichome und ein geringer Anteil von 5-verzweigten Trichomen vorzufinden war. Hingegen waren beim Wildtyp *Ler* fast alle Trichome 3-verzweigt.

Der Verzweigungsphänotyp der Pflanzen R156 bis R159 *try*-82 (5'-*CPC*-Minimalfragment oder *CPC*-Promotor ohne bzw. mit dem Fragment-33 von *TRY*) wurde gegenüber der Mutante verändert (Abb. 96). Alle 4 Konstrukte führten dabei zu ähnlichen Resultaten. Der Anteil höher verzweigter Trichome war geringer geworden: Hatten in der Mutante die meisten Pflanzen einen Anteil der 4-verzweigten Trichome von 50-59,9% und der 5-verzweigten von 30-39,9%, so besaßen die meisten transformierten Pflanzen R156 *try*-82 bis R159 *try*-82 keine höher verzweigten Trichome. Der Anteil der 3-verzweigten Trichome an der Gesamtzahl der Trichome stieg auf bis zu 100% an. Im Vergleich dazu hatten die meisten *try* Pflanzen nur einen Anteil für 3-verzweigte Trichome von bis zu 20%. Auch der Anteil von unterverzweigten Trichomen (1- und 2-verzweigt) war stark angestiegen, die in *try* nicht und im Wildtyp kaum zu finden waren.

Der *CPC*-Promotor führte mit der *TRY*-cDNA folglich zu einer Überkompensation des Verzweigungsphänotyps der *try* Mutante (d.h. weniger Verzweigungen), die in der Kombination

mit Fragment-33 noch verstärkt wurde, während der 3'-Enhancer von *GL1* keine Auswirkung auf die Verzweigung zeigte.

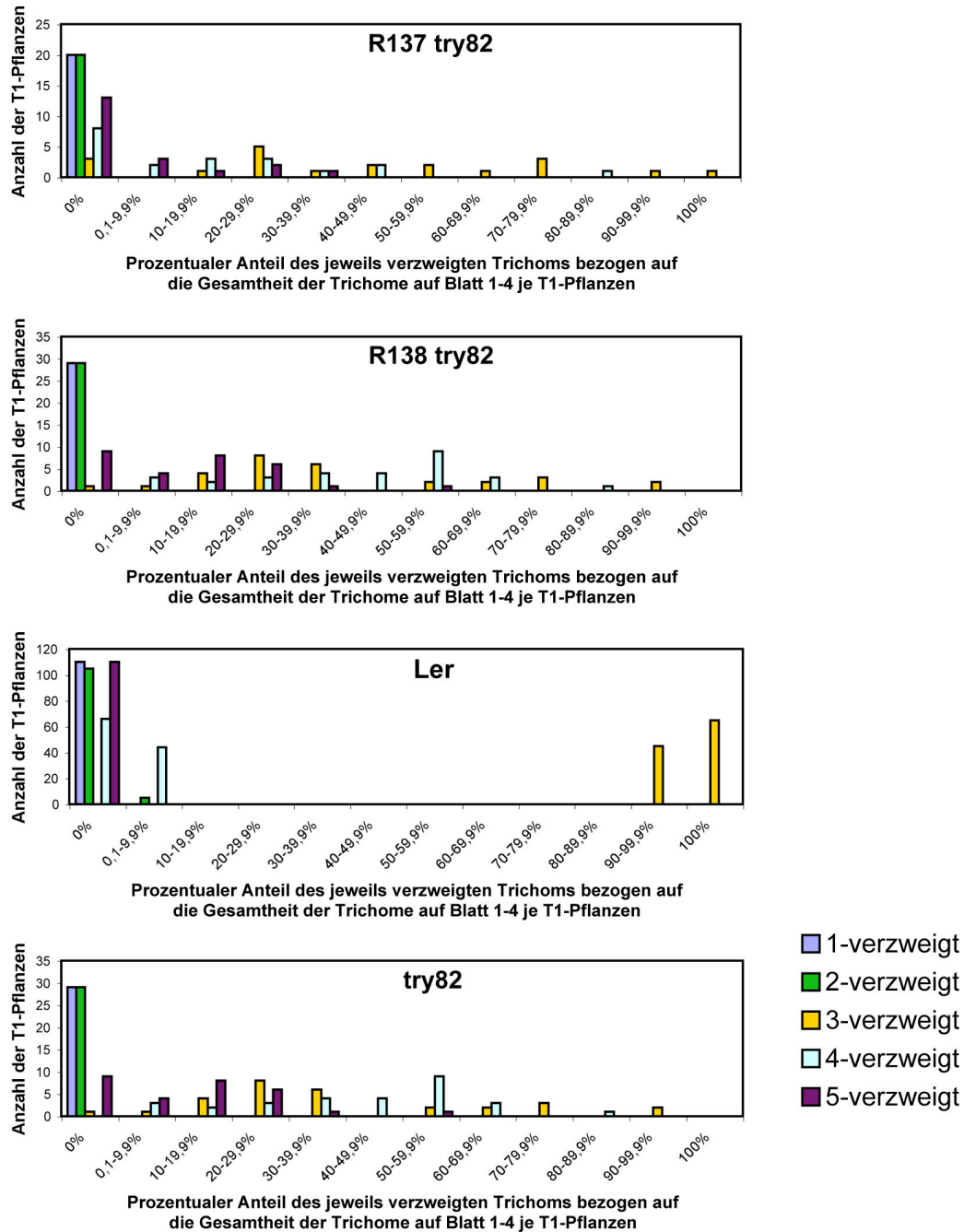
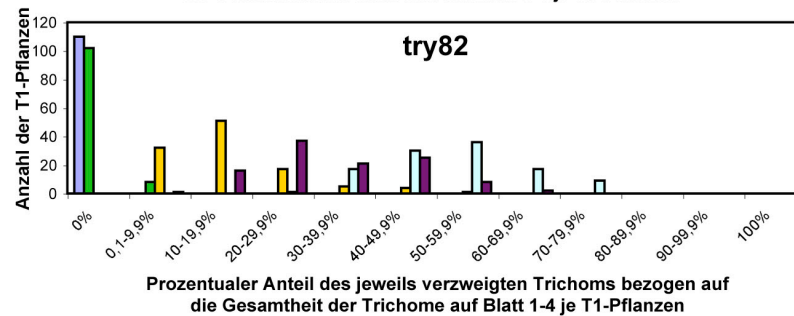
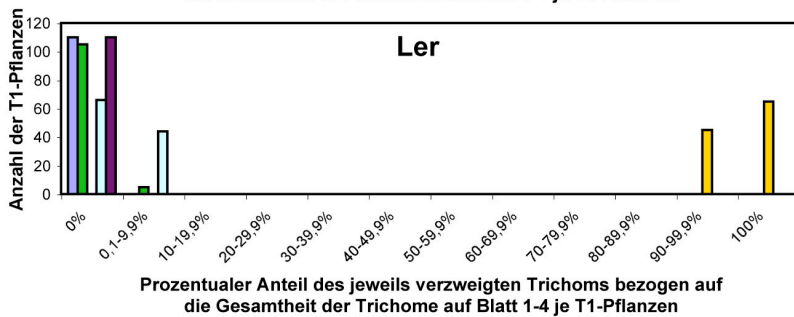
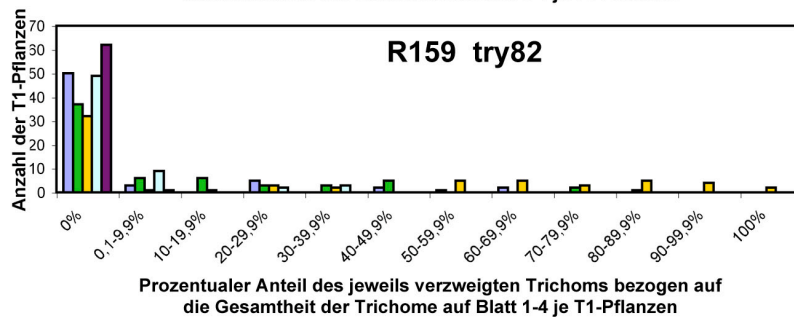
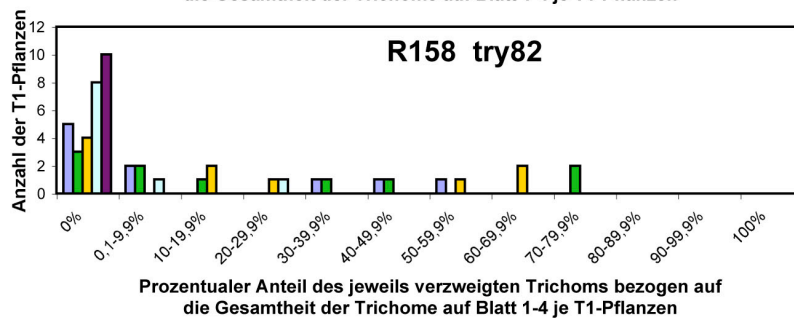
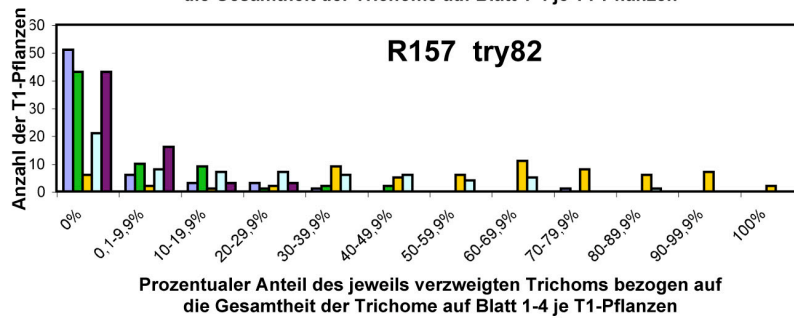
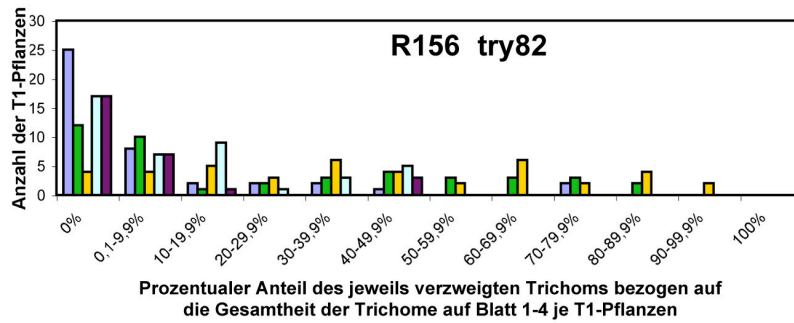


Abbildung 95: Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R137, R138, die den 3'-Enhancer von *GL1* tragen, und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Für jede einzelne T1-Pflanze wurde der Anteil des jeweils verzweigten Trichoms an der Gesamtzahl der Trichome auf Rosettenblatt 1-4 ermittelt (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 0,1-9,9% etc.). Anschließend wurde die Anzahl der Pflanzen bestimmt, die die jeweilige Häufigkeit der verschiedenen Verzweigungen aufweisen. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R137, R138 in *try-82* Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try-82* zur Kontrolle (n = 20, 30, 110, 110).



- 1-verzweigt
- 2-verzweigt
- 3-verzweigt
- 4-verzweigt
- 5-verzweigt

Abbildung 96: Darstellung des prozentualen Anteils einer bestimmten Verzweigungszahl der transgenen *try* Pflanzen mit den Konstrukten R156, R157, R158, R159, die die regulatorische Information von *CPC* tragen, und *try*, sowie *Ler* zur Kontrolle

Für jede einzelne T1-Pflanze wurde der Anteil des jeweils verzweigten Trichoms an der Gesamtzahl der Trichome auf Rosettenblatt 1-4 ermittelt (Aufgeschlüsselt in Kategorien 0%, 0,1-9,9% etc.). Anschließend wurde die Anzahl der Pflanzen bestimmt, die die jeweilige Häufigkeit der verschiedenen Verzweigungen aufweisen. Untersucht wurden die Rettungskonstrukte R156, R157, R158 und R159 in *try*-82 Hintergrund und die Hintergründe *Ler* und *try*-82 zur Kontrolle (n =42, 65, 10, 62, 110, 110).

2.6 Untersuchung der regulatorischen Sequenzen des *CAPRICE*-Gens

2.6.1 Eingrenzung des *CPC* Promotors

Durch Komplementationsversuche der *cpc-1* Funktionsverlust-Mutante konnte bereits gezeigt werden, dass 525 Nukleotide vor der 5'-UTR (-156 Nukleotide vom endogenen Translationsstart) und 309 Nukleotide hinter der cDNA ausreichend sind, um die Rettung der Mutante zu ermöglichen (Wada *et al.*, 1997). Aus diesem Grund kann die GUS-Expression des *CAPRICE* Promotors von -686 bis -158 als charakteristisch für *CPC* angenommen werden. Das Promotorfragment Pr24 deckt diesen Bereich ab (Abb. 97). Dieses Fragment wurde auf einen Bereich von -538 bis -340 weiter eingegrenzt (Pr17).

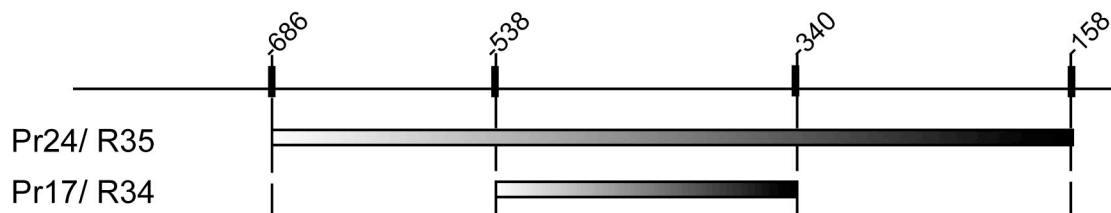


Abbildung 97: 5'-Promotor-Gesamtfragment und das kleinere Fragment von *CPC*

Schematische Darstellung des 5'-Promotorsfragments des *CAPRICE*-Gens in dem Entry-Vektor Pr17 im Vergleich zu dem hier definierten 5'-Gesamtpromotor Pr24. Nebenstehend sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R35 und R34 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *CAPRICE*.

Die entsprechenden GUS-Konstrukte R35 und R34 vermittelten die typische Expression in den Blättern und in der Wurzel (Schellmann *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002). Die Expression in den Rosettenblättern entsprach der *TRY*-Expression, d.h. junge Blätter wiesen eine ubiquitäre Expression auf, während sich die Expression in älteren Blättern auf die Trichome beschränkte (Abb. 98A-C bzw. 98D-F). In der Primärwurzel konnten die charakteristischen, vertikalen Streifen beobachtet werden (Abb. 99A, B). Dabei war die Elongationszone sehr stark gefärbt, während die epidermalen Zellen der meristematischen Zone kaum oder nur schwach gefärbt waren.

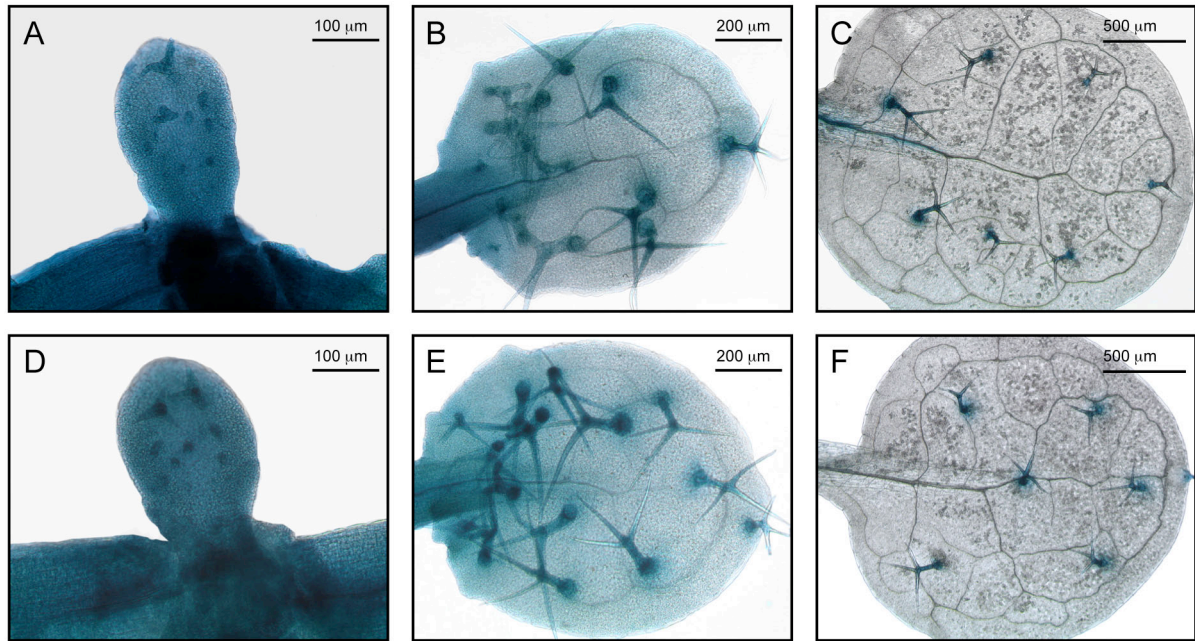


Abbildung 98: Expression der Konstrukte R35 und R34 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE* Gens Pr24 und Pr17 mit den Konstrukten R35 (A-C) und R34 (D-F) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

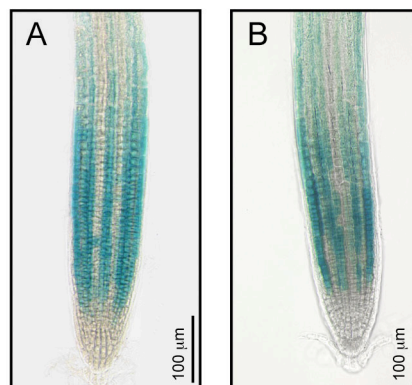


Abbildung 99: Expression der Konstrukte R35 und R34 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE* Gens Pr24 und Pr17 mit den Konstrukten R35 (A) und R34 (B) in Ler Hintergrund 5 Tage alter Keimlinge nach 2,5h Stunde GUS-Färbung.

2.6.2 GUS-Expression der Deletionsfragment des *CPC*-Promotors Pr17

Um das *CPC*-Promotorfragment Pr17 weiter zu charakterisieren, wurde der Effekt weiterer Deletionen auf die GUS-Expression untersucht. Dabei wurden jeweils drei Deletionen in 40 Basenpaar-Schritten durchgeführt (s. Abb. 100).

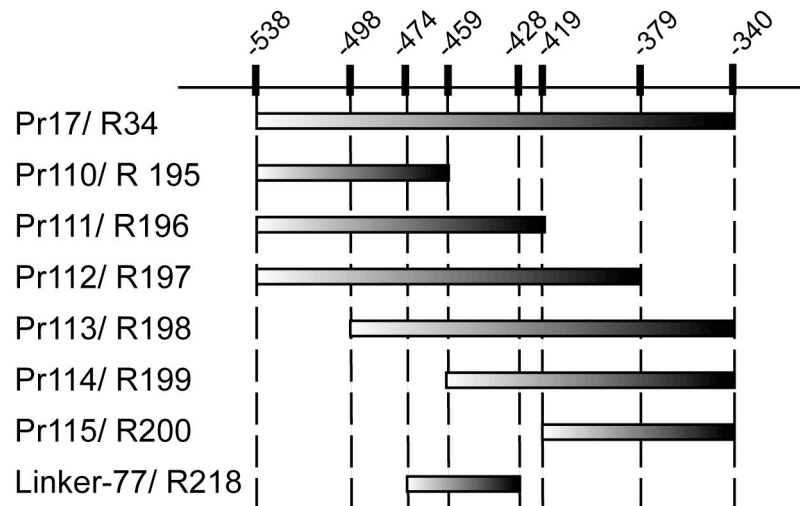


Abbildung 100: Deletionen des 5'-Promotorfragments Pr17 von CPC

Schematische Darstellung der unterschiedlichen Fragmente des 5'-Promotors des *CAPRICE*-Gens in den Entry-Vektoren Pr110-Pr115 und Linker-77 im Vergleich zu dem größeren Promotorfragment Pr17. Nebestehend sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R35, R34, R196-200 und R218 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von *CAPRICE*.

In der proximalen Deletionsserie dirigierte das Fragment Pr112 (-538 bis -379) starke Expression in Blätter der Pflanzen R197 (Abb. 101D-F) und entsprach somit Pr17 (-538 bis -340, vgl. R34 in Abb. 98D-F). In der Wurzel konnte nur sehr schwache Expression gefunden werden, die nicht als Streifen aufgelöst werden konnte (Abb. 102B). Das um 40 Nukleotide kleinere Fragment Pr111 (-538 bis -419) führte zu schwacher GUS-Expression in den Trichomen der Phase 2 bis 6 der Trichomentwicklung der Pflanzen R196 (Abb. 101A-C). Die ubiquitäre Blatt- und Wurzelexpression war hier nicht zu detektieren (Abb. 101A-C, 102A). Das kleinste Fragment Pr110 (-538 bis -459) vermittelte keine GUS-Expression in den Pflanzen R195, weder in den Blättern noch in der Wurzel (ohne Abb.).

In der distalen Deletionsserie des Fragments Pr17 konnte mit dem größten Fragment Pr113 (-498 bis -340) GUS-Färbung der Pflanzen R198 in den Blättern festgestellt werden (Abb. 101H-I), die mit der des Fragments Pr17 vergleichbar war (-538 bis -340, vgl. R34 in Abb. 98D-F). In der Wurzel fand man nur noch sehr schwache Expression, die kaum mehr sichtbar war, aber möglicher Weise ein Reihemuster bildet (Abb. 102C, Pfeilkopf).

Für das kleinere Fragment Pr114 (-458 bis -340) fand man in den Pflanzen R199 (Abb. 101J-M) dieselbe Expression in den Rosettenblättern wie bei R198 (Abb. 101H-I) und R34, aber keine Expression in der Primärwurzel (Abb. 102D). Das kleinste Fragment Pr115 (-419 bis -340) zeigte weder in den Rosettenblättern noch in der Primärwurzel GUS-Expression in den R200 Pflanzen (ohne Abb.).

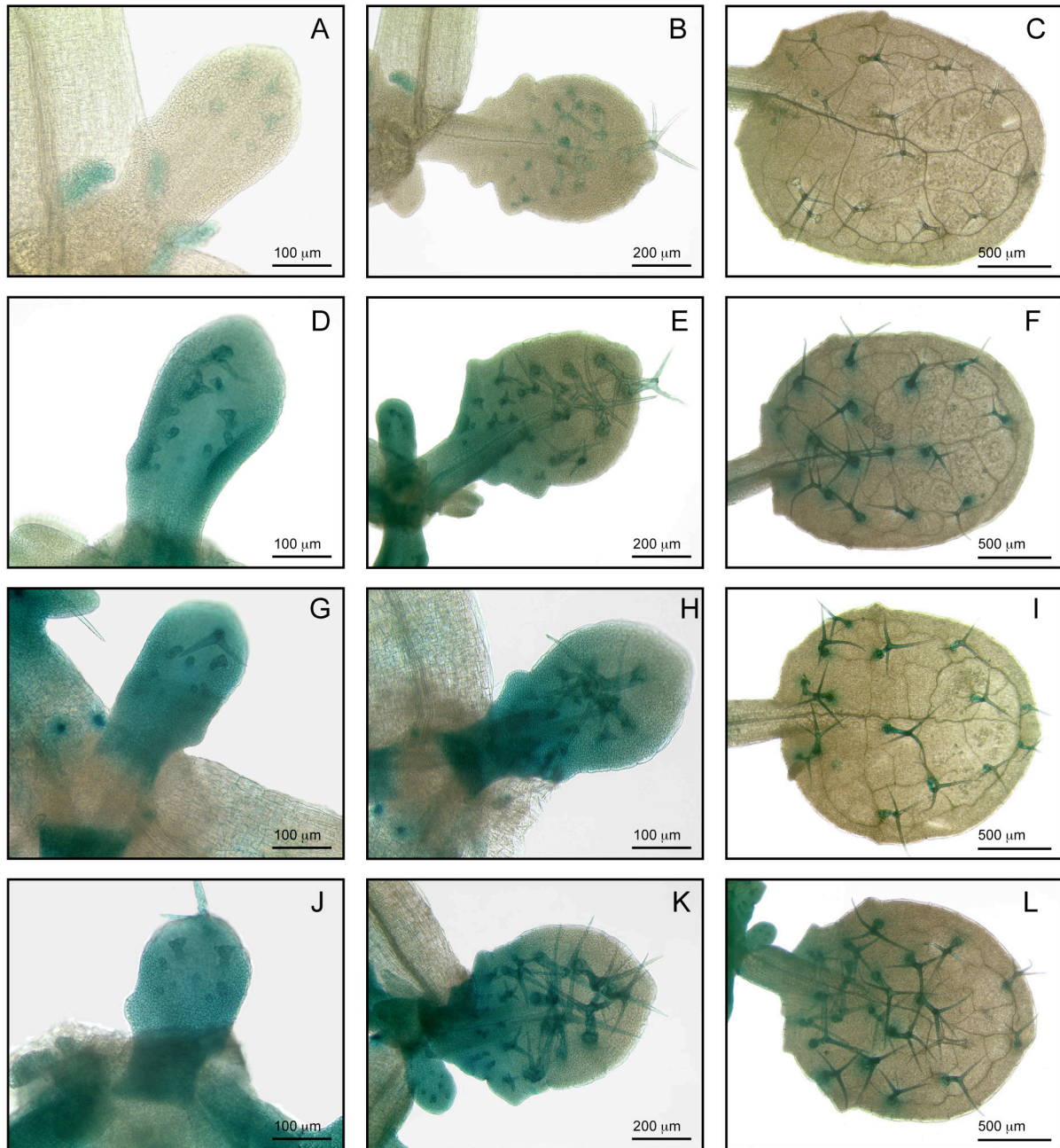


Abbildung 101: Expression der Konstrukte R196 bis R198 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE*-Gens Pr111 bis Pr114 in den Konstrukten R196 (A-C), R197 (D-F), R198 (H-I) und R199 (J-L) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.



Abbildung 102: Expression der Konstrukte R196 bis R198 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE*-Gens Pr111 bis Pr114 in den Konstrukten R196 (A), R197 (B), R198 (C) und R199 (D) in *Ler* Hintergrund 5 Tage alter Keimlinge nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es ist jeweils die Primärwurzel gezeigt. Der Pfeilkopf markiert die kaum mehr sichtbare GUS-Expression.

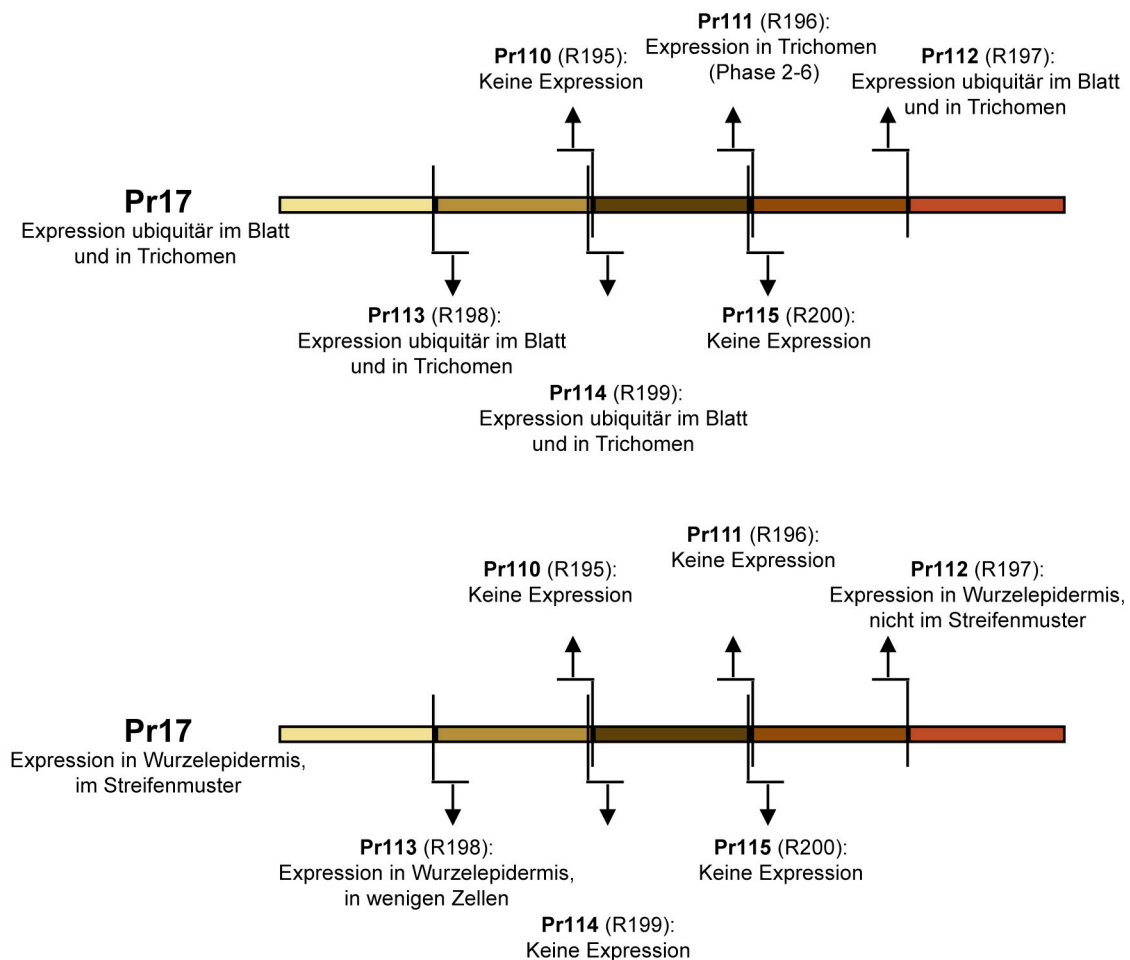


Abbildung 103: Zusammenfassung der Ergebnisse der Deletionen des 5'-CPC-Fragments Pr17

In Farbe sind die einzelnen Bereiche dargestellt, die durch Deletionen des 5'-Promotorfragments Pr17 untersucht wurden. Den einzelnen Domänen wurden Funktionen für die Expression im Wildtyp und für die Rettung der *cpc try* Doppelmutante aufgrund der GUS- und Rettungsanalysen zugewiesen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten (s. Abb. 103), dass der Bereich des *CAPRICE*-Promotors von -458 bis -379 ausreichend war, die richtige Expression in den Rosettenblättern zu vermitteln.

Der Bereich von –458 bis –419 führte zum Verlust der ubiquitären Expression in Blättern, und nur Trichomexpression von Phase 2-6 konnte vermittelt werden. Das Konstrukt R218 trägt als weiteres Deletionskonstrukt für die Trichomexpression den Bereich des *CPC*-Promotors von –474 bis –428 (Linker-77, s. Abb. 100). Die transgenen Pflanzen dieses Konstruktes zeigten keine GUS-Expression in den Blättern und der Primärwurzel (ohne Abb.). Damit befindet sich in den Nukleotiden von –427 bis –419 wichtige Information für die Trichomexpression.

Die korrekte Wurzelexpression konnte nur mit dem Promotorbereich von –538 bis –340 (Pr17) vermittelt werden. GUS-Expression konnte zwar noch mit dem Promotorbereich von –538 bis –379 und in vereinzelt Zellen mit dem Fragment –498 bis –340 detektiert werden, aber das spezifische, intensive Streifenmuster wurde nicht mehr vorgefunden.

2.6.3 *In Silico* Untersuchung des eingegrenzten *CPC*-Promotors

Die Identifikation cis-regulatorischer Elemente des *CPC*-Promotorfragments Pr17, das die korrekte Lokalisation der GUS-Expression lieferte, wurde mit Hilfe der PLACE-Datenbank (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) durchgeführt. Die identifizierten Elemente in Kombination mit den Deletionsfragmenten können der Abb. 104 entnommen werden. Eine ausführliche, kritische Auseinandersetzung mit den vorhandenen Elementen kann der Diskussion entnommen werden. Besondere Beachtung verdienen aber die mehrfach auftretenden W-Boxen (7), das SP8BFIBSP8BIB-Element (5) und die MYB-Bindungsstellen (1, 2), sowie die MYC-Bindungsstelle (3), da sie im Zusammenhang mit den MYB-, WRKY- und bHLH-Faktoren der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung stehen könnten.

Dem Bereich der proximalen Deletion von Pr112 zu Pr111 und einer weiteren Deletion von Pr111 zu Linker-77 konnten keine größeren (mehr als 4 Nukleotide), cis-regulatorischen Elemente zugeordnet werden, obwohl dieser Bereich wichtige Information für die ubiquitäre Expression in den Blättern und die Trichomexpression trägt. Aus diesem Grund wurden für diesen Bereich die cis-regulatorischen Elemente mit nur vier Nukleotiden aufgenommen.

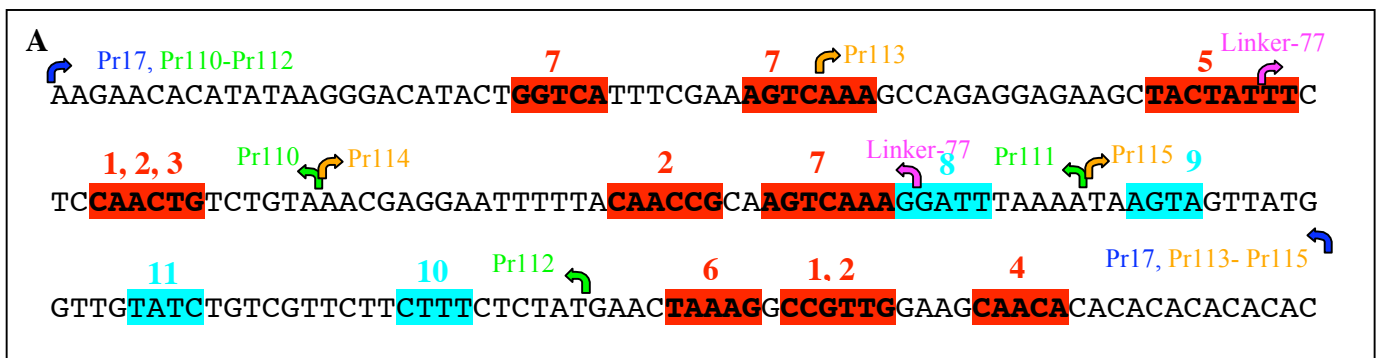


Abbildung 104: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr17 von *CPC*

B

Nr.	Cis-Element	Sequenz	Bindender Faktor	Organismus	Gen/ Funktion
1	MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	ATMYB2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
2	MYBCORE	CNGTTR	ATMYB2, ATMYB1	Arabidopsis thaliana	
3	MYCCONSUSAT	CANNTG	ATMYC2	Arabidopsis thaliana	RD22, Trockenstress, ABA- Signaltransduktion
4	EBOXNAPAPA	CANNTG		Brassica napus	napA
	RAV1AAT	CAACA	RAV1	Arabidopsis thaliana	Element RAV1A in Kombination mit RAV1B In Rosettenblättern und Wurzel
5	SP8BFI8P8BIB	TACTATT	SP8BF	Ipomoea batatas	Sporamin, beta-Amylase
6	TAAAGSTKST1	TAAAG	DOF1	Solanum tuberosum	KST1, Schließzellen spezifische Expression
7	W-BOX	(T)(T)TGACY	WRKY		
	WBOXPCWRKY1	TTTGACT	WRKY	Petroselinum crispum	WRKY1, WRKY3
	WBOXATNPRI	TTGAC	WRKY	Arabidopsis thaliana	NPRI (+70 und +79), SA-Induktion
	WBOXHVISOI	TGACY	WRKY	Hordeum vulgare	ISO1
	WBOXNTERF3	TGACY	WRKY	Nicotiana tabacum	ERF3, Verwundung
	WRKY71OS	TGAC	WRKY711	Oryza sativa	Amy32b, GA-Signaltransduktion
8	ARR1AT	NGATT	ARR1	Arabidopsis thaliana	
9	CACTFTPPCA1	YACT		Flaveria trinervia	ppcA1
10	DOFCOREZM	AAAG	DOF	Zea mays	CyPPDK, PEPC
11	GATABOX	GATA	GATA-BOX-BF	Petunia hybrida	Cab22
				Arabidopsis thaliana	
				Oryza sativa	

Abbildung 104: Zuordnung der durch PLACE identifizierten, cis-regulatorischen Elemente und der untersuchten Fragmente des 5'-Promotorfragments Pr17 von CPC

In A ist die Sequenz des 5'-Promotors von -538 bis -340 bezogen auf den endogenen Translationsstart von CPC dargestellt. Die Nummern in rot geben die Zuweisung zu den in B aufgeführten, cis-regulatorischen Elementen mit mehr als 5 Nukleotiden an. Sie befinden sich über den entsprechenden rot unterlegten Nukleotiden, die das jeweilige Element charakterisieren. Die türkis markierten Nukleotide kennzeichnen die Elemente mit 4 Nukleotiden die nur für den Bereich von -428 bis -379 bestimmt wurden. Die gebogenen Pfeile kennzeichnen den Anfang bzw. das Ende der Promotorfragmente, die jeweils daneben zu finden sind: Pr17, Pr109-112, Pr113-Pr116 und Linker-77.

In B sind die cis-regulatorischen Elemente mit zugehöriger Nukleotidsequenz, den bindenden Transkriptionsfaktoren (sofern bekannt), den Organismen, in den sie untersucht wurden, sowie das Gen, die Funktion bzw. der Stoffwechselweg, in dem sie identifiziert wurden, aufgelistet. Alle unwahrscheinlichen Elemente, wie z.B. PolyA-Signale, Pollen sowie Agrobacterium spezifische Elemente, TATA- und CAAT-Boxen wurden nicht in die Liste aufgenommen. Außerdem wurden die Bindungsstellen, die durch nur 4 Nukleotide gekennzeichnet sind (DOFCORE, ARR1AAT, CACTFTPPCA1, GATA-Box), aufgrund ihrer Vielzahl außerhalb des Bereiches von -428 bis -379 außer Acht gelassen.

2.6.4 Mutagenese verschiedener, cis-regulatorischen Elemente des CPC-Promotors Pr17

Um die regulatorische Sequenz des CPC-Promotors Pr17 von 199 weiter zu untersuchen, wurden, ausgewählte, cis-regulatorische Element mutagenisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine neuen, bisher bekannten Elemente produziert werden. Wie der Abb. 105 entnommen werden kann, wurden die zweite und dritte W-Box, sowie die beiden MYB-Bindungsstellen verändert.

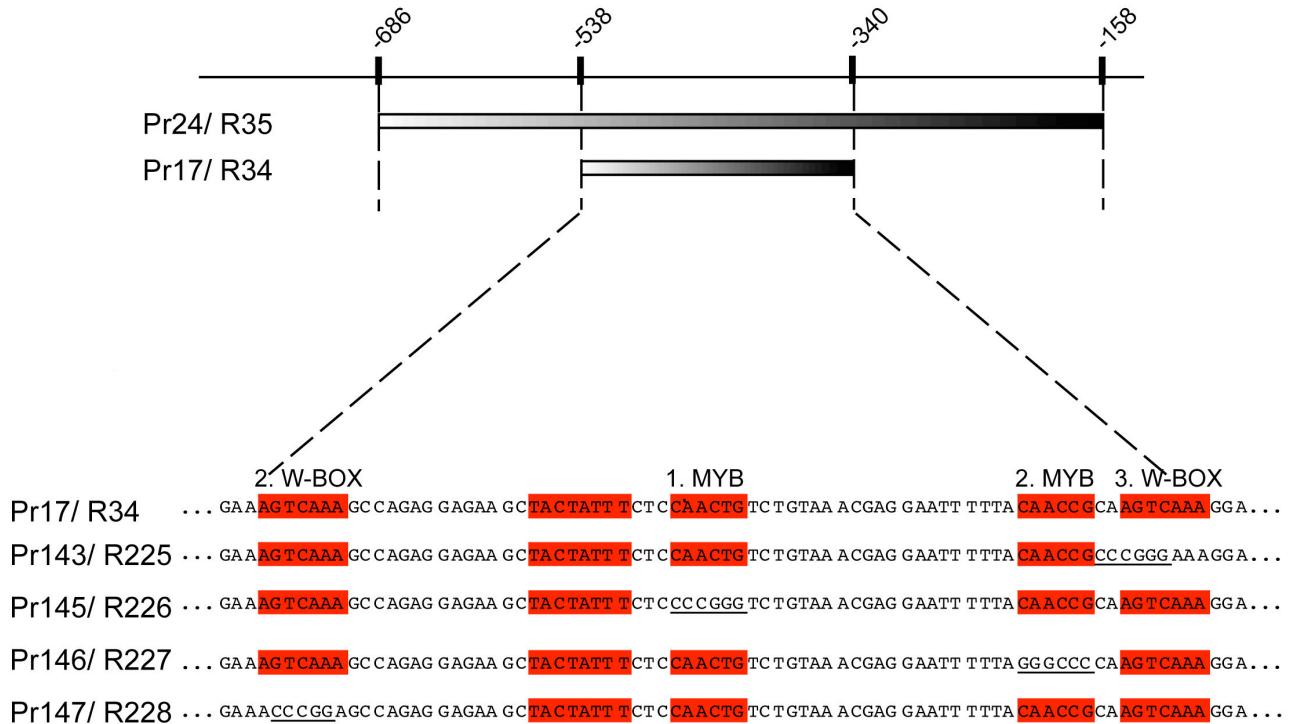


Abbildung 105: Schematische Darstellung der Mutagenese der MYB-Elemente und W-Boxen von Pr17

Schema der Mutagenese-Fragmente des CPC-Promotorfragments Pr17. Das 199 Nukleotid große Fragment wurde an 4 Stellen durch Nukleotidaustausch verändert, dabei wurde die zweite und letzte W-Box in den Fragmenten Pr147 und Pr143, sowie die erste und zweite MYB-Bindungsstelle in den Fragmenten Pr145 und Pr 146 mutagenisiert. In rot sind die cis-regulatorischen Elemente unterlegt. Die mutagenisierten Nukleotide wurden unterstrichen. Neben den Promotorfragmenten sind die zugehörigen GUS-Konstrukte R225-R228 aufgelistet. Die Positionsnummern beziehen sich auf den endogenen Translationsstart von CAPRICE.

Die GUS-Analyse der mutagenisierten Promotorfragmente des Pr17 zeigt, dass die Veränderung der zweiten W-Box in dem Konstrukt R228 und der ersten MYB-Bindungsstelle in dem Konstrukt R226 dasselbe Expressionsmuster zeigten wie die Pflanzen R34 (vgl. Abb. 98A, 99A), die das intakte Fragment Pr17 tragen. Dies galt für die Expression in den Rosettenblättern (Abb. 106D-F, J-K) als auch für die Primärwurzeln, die das charakteristische Streifenmuster aufwiesen (Abb. 107A, B). Im Gegensatz dazu führte die Mutagenese der letzten W-BOX als auch der zweiten MYB-Bindungsstelle zum Verlust der Expression in den Primärwurzeln (R225 und R227, ohne Abb.). Die GUS-Expression in den Rosettenblättern war nur noch in Trichomen von Phase 2 bis 6

nachzuweisen (Abb. 106A, B, G, H). Ubiquitäre Expression in den Blättern konnte in keinem Stadium detektiert werden (Abb. 106A-C, 92G-I).

Damit sind die zweite MYB-Bindungsstelle und die dritte W-Box von essentieller Bedeutung, und ihr Verlust liefert dasselbe Expressionsmuster wie das proximale Deletionsfragment Pr111, in dem die beiden Bindungsstellen allerdings noch vorhanden sind.

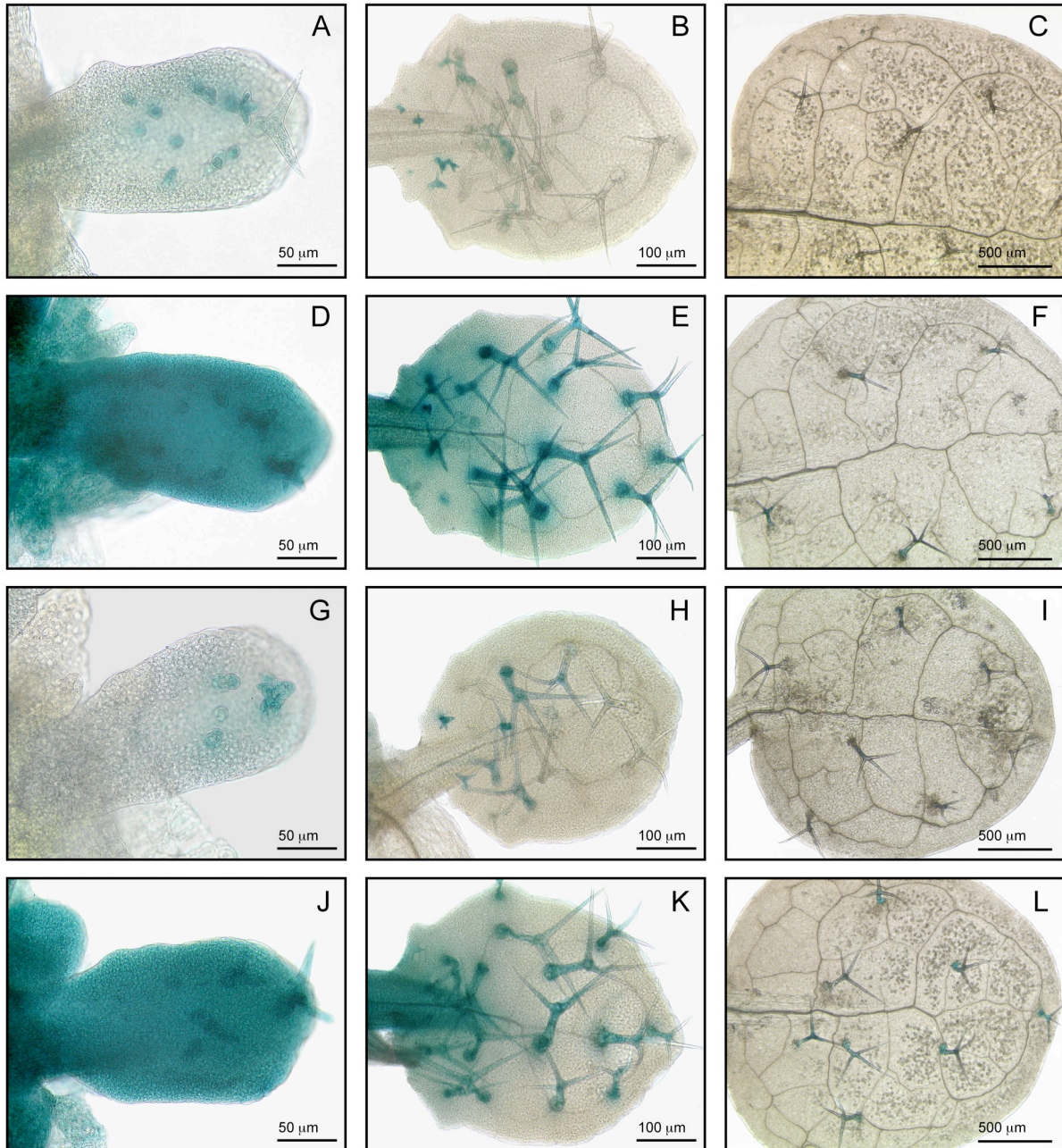


Abbildung 106: Expression der Konstrukte R225 bis R228 in Rosettenblättern von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der mutagenisierten 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE*-Gens Pr143 und Pr145 bis Pr147 mit den Konstrukten R225 (A-C; Mutation 3. W-Box), R226 (D-F; Mutation 1. MYB), R227 (H-I; Mutation 2. MYB) und R228 (J-L; Mutation 2. W-Box) in Ler Hintergrund nach 24 Stunden GUS-Färbung. Es sind jeweils drei verschiedene Blattstadien mit zunehmendem Alter dargestellt.

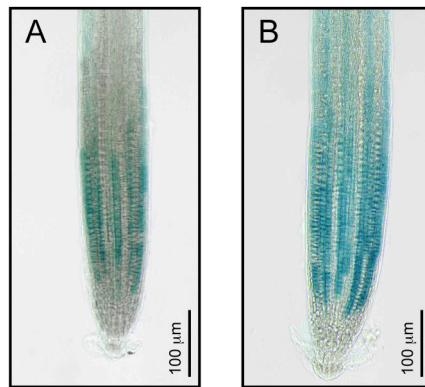


Abbildung 107: Expression der Konstrukte R226 und R228 in der Primärwurzel von Ler Pflanzen

Lokalisierung der GUS-Expression der 5'-Promotorfragmente des *CAPRICE*-Gens Pr145 bis Pr147 mit den Konstrukten R226 (A) und R228 (B) in Ler Hintergrund 5 Tage alter Keimlinge nach 1 Stunde GUS-Färbung.

2.6.5 Regulation der CPC-Expression durch Faktoren der Trichom-Musterbildung

Die Regulatoren der Trichom-Musterbildung könnten auch die Rolle übernehmen, die CPC-Expression zu regulieren. Deshalb wurden *Ler* Pflanzen, die das pCPC::GUS Konstrukt tragen mit einer Kombination der Trichom-Musterbildungsaktivatoren transient transformiert. Hierzu wurden die Kotyledonen der Pflanzen mit den 35S-Konstrukte von *GL1*, *GL2*, *GL3* und *TTG1* gemeinsam beschossen und anschließend auf ektopische GUS-Expression in der Epidermis der Keimblätter untersucht. Wie Abb. 108A entnommen werden kann, befand sich vor der transienten Transformation keine GUS-Expression in den Kotyledonen der pCPC::GUS Pflanzen. Durch den Partikelbeschuss konnte aber die Expression in den einzelnen, getroffenen Zellen der Kotyledonen aktiviert werden (Abb. 108A, B).

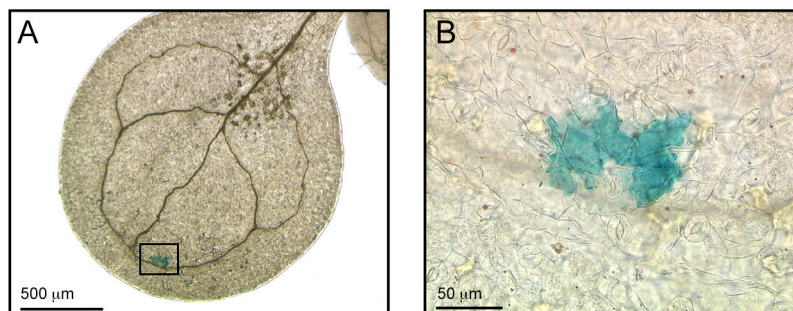


Abbildung 108: Expression in einzelnen Epidermiszellen nach Partikelbeschuss von pCPC::GUS Pflanzen

GUS-Expression nach 24 Stunden Färbung in durch Partikelbeschuss transient transformierten Epidermiszellen der Kotyledonen 7 Tage alter pCPC::GUS *Ler* Pflanzen. Die Kombination der 35S-Konstrukte *GL1*, *GL2*, *GL3*, *TTG1* wurden zusammen mit 35S::GFP bombardiert. In A ist ein komplettes Keimblatt mit einer getroffenen Epidermiszelle dargestellt. In B ist die getroffene Zelle im Detail abgebildet.

2.7 Vergleich der regulatorischen Bereiche der analysierten Promotoren

2.7.1 Vergleich der regulatorischen Region von *TRY* und *CPC*

		1		50
5'-TRY (500)	(1)	-----TAAACAACTAATTTCTTAGAAATACAAATTG-GACTTGAAAT		
5'-ETC2 (500)	(1)	-----AAAAATTTCATAAATA--TAAAAAGAAAACTGTGATTTTAAA		
5'-CPC (500)	(1)	-----TCAAGGCCAGAGGAGAGCTACTATTTCTCCAAAC		
5'-ETC1 (500)	(1)	TTGTACTCAACATAGTGTATTATATCGACTTA---ATTATGATTTATTC		
5'-ETC3 (500)	(1)	-----AAGTAATGTATAAATAATTAATAATG---ATTTTGTCTTAATA		
		51		100
5'-TRY (500)	(44)	A---CAAATAAGGAAAG--AACACACAAATC-AATAACTAAA-ACATC		
5'-ETC2 (500)	(42)	T---TAGAACTTGTAAG--ATTACGTGTTCA--AATAT-TTAT-TGAGA		
5'-CPC (500)	(35)	TGTCGTAAACGAGGAATTTTACAACCGCAAGTCAAGGATTT--AAAA		
5'-ETC1 (500)	(48)	A---TCTGCGTGTAAAT--ATAAACAATCAAGT-AGTATCATTT-TAAAA		
5'-ETC3 (500)	(41)	TAT-CCAAATTTCAATCTATTAATGACAAAGGAGTATAATTTCTGATT		
		101		150
5'-TRY (500)	(87)	GTTGAACCTTGCACTCGCCAAATAAATCAAT-TAA-ATCCCATTTCT-		
5'-ETC2 (500)	(83)	AGTGTATTTCATGTGATGTTTTCACITCGA-TTTAATACGTTACTAGG		
5'-CPC (500)	(83)	TAAGTAGTTATGGTGT-TATCTGTCGTCTCTCTTCTCTATGAACATAAG		
5'-ETC1 (500)	(91)	AAAGCAATTAGACAAACATGACGGAGCAATGTGTAAATGCAACATGT		
5'-ETC3 (500)	(90)	GAAATGACCTGGAATAGCAATCAGAAAGGCTT-TGA--AAACAATGTGT		
		151		200
5'-TRY (500)	(134)	-AAAAAGATAGTAGGTTAGAAATTTGAATAATGGAAATAAAATATG		
5'-ETC2 (500)	(132)	CAAAAAATATAAACTAGCACGCCATTTTAGTGACTGTTAAAA-----TG		
5'-CPC (500)	(132)	---GCCGTTGGAGCAACACACACACACACAGTGAACACTACAG-TT		
5'-ETC1 (500)	(141)	CTTATGATTCTCATTTGGTCCTTAAACGAATCACTCGAGCATTCACACA		
5'-ETC3 (500)	(137)	---TGATTATTATGATCTT--AATTACGGCATGTATCAAT--ATTTA		
		201		250
5'-TRY (500)	(183)	TTAGGATCTACGAATGAGAACAAAGTTAGCCTTCAAAATACTTACAAATC		
5'-ETC2 (500)	(176)	TTCTGTTATAGGTGAGA-AACAAATCTGA--TCAAAATTTATTGTGAGC		
5'-CPC (500)	(178)	TACAGATTCGTTTCTTTAGCTCAATCGAATTATATTATTTCTT--AATC		
5'-ETC1 (500)	(191)	TACTGACATATATTGGCTGCCACCCATAAGTTGCTAAATTAATT--AATA		
5'-ETC3 (500)	(179)	TACA-ACCTATGTTCCAGTCCAGGCCATCCAAAGGAGTAAATGAAGTCA		
		251		300
5'-TRY (500)	(233)	CCATAAAAGACTTC--ATC-TCCATGTGTATTTGAGTGTCA-ACGACAA		
5'-ETC2 (500)	(223)	ATTATGAACCTTTTGGAAATAGTAAAAACAAATCGAACGTATACGAAAT		
5'-CPC (500)	(226)	AGTCAATATTTAAAT--AATGGAGGATGATGATAAGTATTAATAATAAAT		
5'-ETC1 (500)	(239)	AGAATAATATTAGTTAAATCCGATTTAGGAAACAAAGTACGATATACA		
5'-ETC3 (500)	(228)	CGGGTACTTGTGGTTT-TTATTTGGTTCGCAACTTGCACCTGCAAGATA		
		301		350
5'-TRY (500)	(279)	GTCACACAAAGGGTAAAGGTTCAACAGACCAACACACTCTTACTA		
5'-ETC2 (500)	(273)	TATGTTTTGACGTATTCGATCGGGATATATAAAACAAAAATGTGAATTA		
5'-CPC (500)	(275)	TATTTAGGATTAAATCAGACATGCGCAGTTATATATAATCAGTTTGATT		
5'-ETC1 (500)	(289)	TCATACACGATTCCCTTAATGTGAAACCGACCAACCGGTCTTAACCTT		
5'-ETC3 (500)	(277)	GCATACAAATATTATATATATTAATGAGAACAAACCAATTTAGTAATTT		
		351		400
5'-TRY (500)	(329)	TTAGTTTTGCAAGGCCGTTCTGTTGGACATTTCCTCTCTCTC-TCCCC		
5'-ETC2 (500)	(323)	TAAATTTAGGAATAT--ATACGTAGAAATTCCAATAAAAAATAAATCACC		
5'-CPC (500)	(325)	TTCTTTTCTT-----TTTCGAGCCCTCTCTCTCTCCTCT-TTCT		
5'-ETC1 (500)	(339)	TGCCCTTATAAA-----TACAGAAATACACTTCATGTTCT-TCCCTTAA		
5'-ETC3 (500)	(327)	AAATATCCTTTAATAGAAACCGACCAACCGTGGACCGTTGGTTACT		
		401		450
5'-TRY (500)	(378)	TCTTCTCTCT-TCTTGTTCGCTCTATAA--ACTCTCATCTCTCACGCTCTT		
5'-ETC2 (500)	(371)	TATCTCTCTCTCTCTCTTTTATATAAATATTTTTCCTCACATCTTT		
5'-CPC (500)	(366)	TTTCCGAGAACCCAAACAAAAAAGAGCTACTATTAATCCCTCCCTCTG		
5'-ETC1 (500)	(382)	AATCCATCATCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTACCTTAACCGCTAC		
5'-ETC3 (500)	(377)	TGATTTGGTTAGTTGCTATAAATAGAAATGATGGTTTCGTGTGCAACCTT		
		451		500
5'-TRY (500)	(425)	TTTTC--CTTACATTCTCAAACTCAAAATTT-CA---TCAATTAATTT		
5'-ETC2 (500)	(421)	TCTATATCTTGCATCTCTCAAACTCTACATTTTCAAGTTCTCTGTAAAT		
5'-CPC (500)	(416)	AGGAAATCATTTCTTCTTCTTCTCGAGATTATCTCTTCTC-TCTCTCT		
5'-ETC1 (500)	(432)	CAAAACCGTATTGATTGATAATATGACACGGTGGCA-----TCGTAATCT		
5'-ETC3 (500)	(427)	AAAATACGACCACCTCTCTCAGAGTACTCTCTTAGTTTCTTCTTCTCT		
		501		536
5'-TRY (500)	(469)	CTCTCTATTTTCTTTCTTACTTCAATAGTA----		
5'-ETC2 (500)	(471)	-TATCTAATATCTTCTATTT-TCCAGTAGTT----		
5'-CPC (500)	(465)	CTTCTCTGTGTGTTTCTGTTCTTCAAGATTAGTTTCG		
5'-ETC1 (500)	(477)	TTGTGTACTAAGGTGCTTTTGAG-----		
5'-ETC3 (500)	(477)	CTTTGTAAATCGGTGCCGTTTGAC-----		

Abbildung 109: Alignment der Promotoren der homologen Gene *TRY*, *CPC*, *ETC1*, *ETC2* und *ETC3*

Alignment der Promotoren der Gene *TRY*, *CPC*, *ETC1*, *ETC2* und *ETC3* (von -500 bis -1 bezogen auf den jeweiligen endogenen Translationsstart) mit dem Programm AlignX.

Zunächst wurde versucht, die Promotoren (-500 bis -1 bezogen auf den jeweiligen endogenen Translationsstart) von *TRY* und *CPC* mit den Homologen Genen *ETC1*, *ETC2* und *ETC3* zu

vergleichen. Dabei wurde eine Alignment mit AlignX (VectorNT1) durchgeführt (Abb. 109). Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, dass kein einziger Promotorbereich zu homologisieren war.

Deshalb wurde ein Vergleich der cis-regulatorischen Elemente zwischen den als funktional charakterisierten Promotorfragmenten Pr15 des *TRY*-Gens und Pr17 des *CPC*-Gens vorgenommen (Tab. 16). Dabei stellte sich heraus, dass nur vier der analysierten cis-regulatorischen Elemente in beiden Promotoren zu finden waren. Dabei handelte es sich um die MYC-Bindungsstelle (MYCCONSENSUSAT), die gleichzeitig durch MYB-Bindungsstellen charakterisiert werden kann. In beiden Fragmenten waren aber auch MYB-Bindungsstellen zu finden, die allerdings durch die Bindung jeweils unterschiedlicher MYB-Transkriptionsfaktoren charakterisiert wurden. Des Weiteren fand man in beiden Promotorbereichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor RAV1, das Element SP8BFIBSP8BIB und mehrere W-Boxen.

Tabelle 16: Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente der Promotorfragmente Pr15 des *TRY*-Gens und Pr17 des *CPC*-Gens

Gemeinsame cis-Elemente der beiden regulatorischen Bereiche sind gelb markiert.

Cis-Element	5'-TRY (Pr15)	5'-CPC (Pr17)
ABRELATERD1	1	-
ACGTABOX	1	-
ACGTATERD1	1	-
AMYBOX1	1	-
DPBFCOREDCDC3	1	-
ELRECOREPCR1	1	-
GAREAT, MYBGAHV	1	-
GT1CONSENSUS	12	-
MARTBOX	2	-
MYB2CONSENSUSAT	-	2
MYBCORE	-	3
MYBPLANT	1	-
MYBPZM	1	-
MYCATERD1/ MYCATRD22	1	-
MYCCONSENSUSAT EBOXNAPA	2	2
NAPINMOTIFBN	1	-
PROLAMINBOXOSGLUB1	1	-
PYRIMIDINEBOXHVEPB1	3	-
QELEMENTZM13	1	-
RAV1AAT	4	1
REALPHALGLHCB21	1	-
SP8BFIBSP8BIB	1	1
TAAAGSTKST1	-	1
TBOXATGAPB	1	-
W-BOX	2	3

Bei der Motiv-Suche mit dem Programm MEME (<http://meme.sdsc.edu/meme/website/meme.html>) konnte bei dem Vergleich der regulatorischen 5'-Minimalbereiche von *TRY* (Pr15) und *CPC* (Pr17) mit den Fragmenten des 3'-Enhancers des *GLI*-Gens (Fragmente-28 und -30) immer wieder eine kurze Sequenz von 10 Nukleotiden (TCGTTG/TACAC/T, hier definiert als Box1)

wiedergefunden werden (Abb. 110A). Sehr ähnliche Sequenzen waren auch in dem Fragment-32 des 3'-Enhancers, dem ersten Intron und dem distalen 5'-Promotorfragment Pr1 des *GL1*-Gens zu identifizieren (Abb. 110B). Ein bindender Faktor für diesen Sequenzbereich wurde bisher nicht beschrieben.

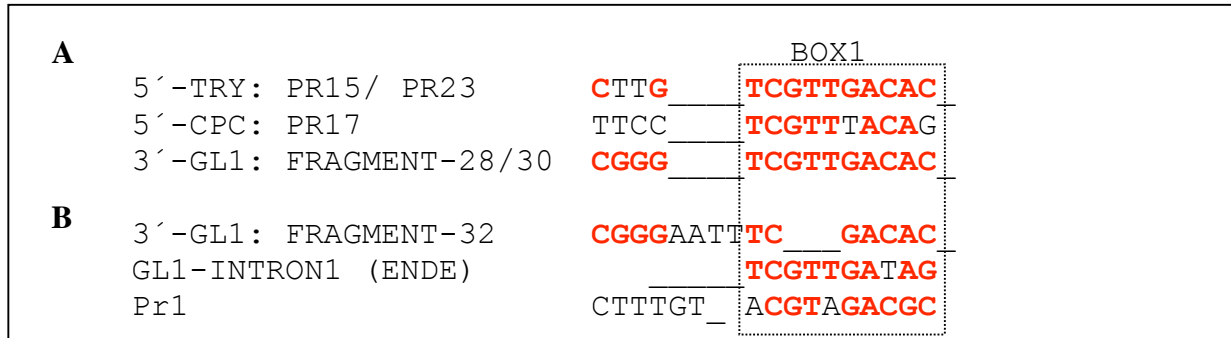


Abbildung 110: Gemeinsame Motive der Fragmente Pr15, Pr24, Pr1, 3'-Enhancer und 1. Intron von *GL1*

A) Ergebnisse aus einem MEME Motivvergleich der Promotorfragmente Pr15 des *TRY*-Gens und Pr17 des *CPC*-Gens mit den Fragment-28 oder Fragment-30 des 3-Enhancers des *GL1*-Gens.

B) Ähnliche Sequenzen können auch in dem Fragment-32 des 3'-Enhancers, im ersten Intron und in dem distalen 5'-Promotefragment Pr 1 des *GL1*-Gens gefunden werden.

Die Deletionen der Box 1 (s. Abb. 111) aus den Fragmenten-28, -30, -32 des 3'-Enhancers des *GL1*-Gens (Pr64, Pr65, Pr66) und aus dem Fragment Pr23 des *TRY*-Gens (Pr73) führte in den entsprechenden, transgenen Pflanzen R150, R152 und R153 zum Verlust der GUS-Expression (vgl. Abschnitt 2.3.11 und 2.5.5) bzw. für R151 zu der bereits beschriebenen basalen Blattexpression verbunden mit der Schließzellenexpression (vgl. Abb. 50, Abschnitt 2.3.11).

Aus Pr23, Pr17, Fragment-28 bzw. -30 und Fragment-32 wurde jeweils eine kurze Sequenz, die die Box 1 des jeweiligen Fragments umfasst, benutzt, um die Regulation der GUS-Expression über den 35S-Minimalpromotor zu vermitteln (s. Abb. 111): Eine 25 Nukleotidsequenz des Fragments Pr23 des *TRY*-Gens wurde in Kombination mit Fragment-33 für das Konstrukt R148, eine 48 Nukleotidsequenz aus Pr17 des *CPC*-Gens für das Konstrukt R218, sowie eine 40 Nukleotidsequenz aus dem Fragment-28/-30 für das Konstrukt R214 und eine 40 Nukleotidsequenz aus dem Fragment-32 für das Konstrukt R215 des *GL1*-3'-Enhancers als regulatorische Information eingesetzt. Außerdem wurde das gesamte erste Intron des *GLABRA1*-Gens in R180 genutzt. GUS-Expression konnte in den transgenen *Ler* Pflanzen R148, R218, R214, R215 und R180 aber nicht detektiert werden (ohne Abb.). Damit ist die Box 1 zwar notwendig, aber nicht ausreichend zur Regulation der Expression durch die entsprechenden Fragment-28, -30, -32, Pr23 und Pr17.

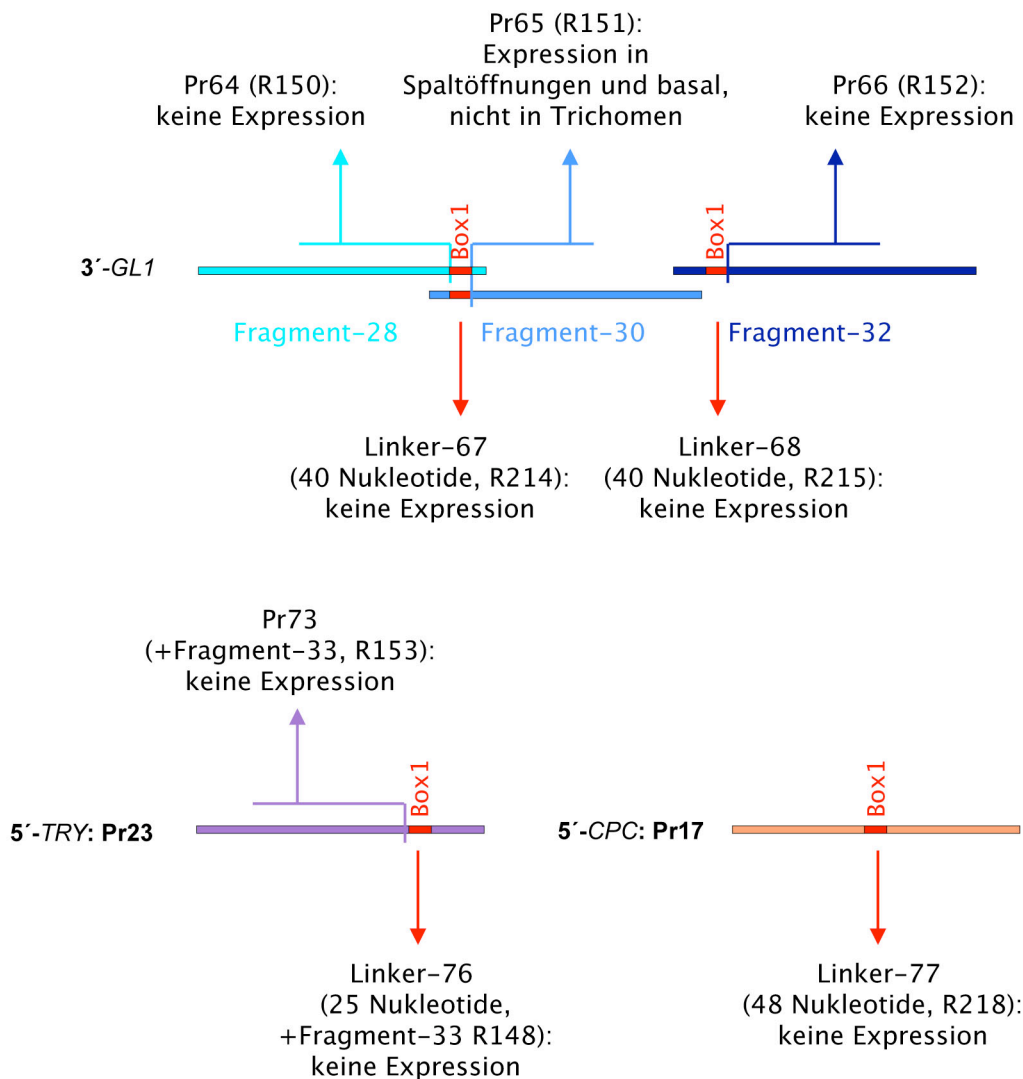


Abbildung 111: Schematische Darstellung der Deletionsfragmente zur Überprüfung der Regulation durch Box1 von Fragment-28, -30, -32, Pr23 und Pr17

Es wurde jeweils dargestellt, welcher Bereich von den Ursprungsfragmenten Fragment-28, -30, -32, Pr23 und Pr17 (jeweils in unterschiedlicher Farbe) zur GUS-Expressionsanalyse benutzt wurde. In rot ist die Box 1 aus Abb. 110 dargestellt, die jeweils mit benachbarten Nukleotiden zur Steuerung der Regulation benutzt wurde.

Der direkte Vergleich der Sequenzen des *TRY*-Promotorfragments Pr15 und des *CPC*-Promotorfragments Pr17 ermöglichte durch den Vergleich der cis-regulatorischen Elemente, sowie MEME-Analyse eine Homologisierung eines kleinen Sequenzabschnittes (Abb. 112). Dabei zeigte sich, dass man die erste MYB-Bindungsstelle von *CPC* mit der MYC-Bindungsstelle von *TRY* homologisieren kann, da auch die benachbarten Nukleotide übereinstimmen. Die nachfolgende Sequenz weist hohe Ähnlichkeiten auf. Die Box1 unterscheidet sich zwischen den beiden Fragmenten nur in einer Base. Dadurch geht in *CPC* (Pr17) eine W-Box verloren. Dieser Sequenzabschnitt von *TRY* konnte aber andererseits auch mit einer 10 Nukleotide später folgenden Sequenz von *CPC* homologisiert werden, so dass ein 14 Nukleotide langer, homologer Sequenzabschnitt vorliegt, der der zweiten MYB-Bindungsstelle sowie der folgenden dritten W-

BOX von *CPC* entspricht. Beide Elemente sind in *TRY* nicht mehr vorhanden, da in der MYB-Bindungsstelle zwei Nukleotide und in der W-Box ein Nukleotid ausgetauscht wurden.

Es zeigte sich bereits, dass für die *CPC*-Expression gerade die zweite MYB- und dritte WRKY-Bindungsstelle für die Expression durch das Fragment Pr17 von Bedeutung waren, da ihre Mutagenese (Vgl. R225 und R227 in Abschnitt 2.6.4) zum Verlust der starken GUS-Expression im Rosettenblatt und in der Wurzelepidermis führte. Die Mutagenese der ersten MYB-Bindungsstelle führte hingegen zu keiner Änderung der GUS-Expression gegenüber Pr17 (Vgl. R226 in Abschnitt 2.6.4). Für die Mutagenese der entsprechenden Elemente von *TRY* in den Fragments Pr15 bzw. Pr23 stehen die Ergebnisse zurzeit noch aus.

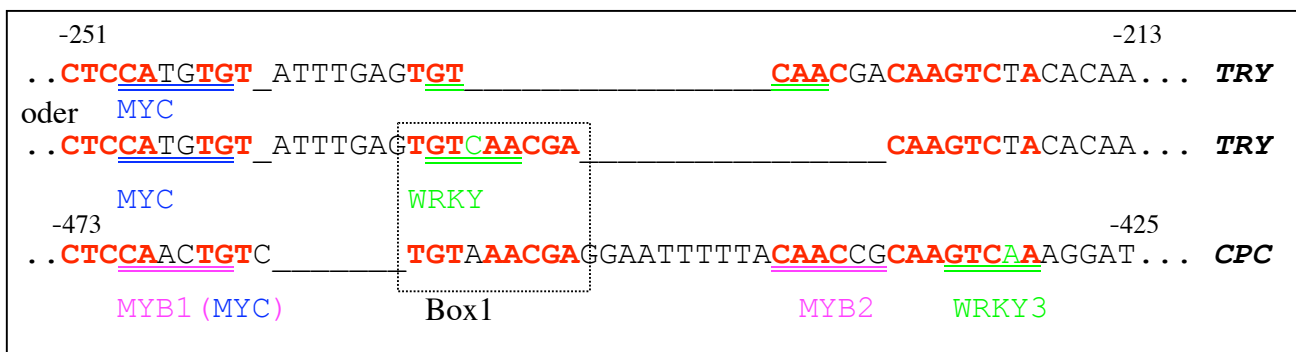


Abbildung 112: Homologer Bereich zwischen Pr23 und Pr17

Schematische Darstellung der Homologisierung zweier kurzer Sequenzabschnitte des Fragments Pr23 des *TRY*-Gens und Pr17 des *CPC*-Gens. Es gibt zwei Möglichkeiten den Abschnitt von Pr23 zu Pr17 in Deckung zu bringen. Die wichtigen MYC-, MYB- und WRKY-Bindungsstellen sind doppelt unterstrichen. Die durch MEME identifizierte Box1 ist umrahmt.

2.7.2 Vergleich der regulatorischen Bereiche von *GL1* und *WER*

Die regulatorischen Bereiche der Gene *GL1* und *WER* sollten miteinander verglichen werden. Da sie auf Proteinebene eine sehr hohe Homologie zueinander aufweisen (Lee und Schiefelbein, 1999) und die Funktion ihrer Proteine austauschbar ist (Lee und Schiefelbein, 2001), könnten sie bei vergleichbarer Funktion als Aktivator der Trichom- bzw. Wurzelhaar-Musterbildung trotz unterschiedlicher Expressionsdomänen mit einer ähnlichen, transkriptionellen Regulation ausgestattet sein. Als weiteres nah verwandtes Gen zu *GL1* und *WER* wurde *AtMYB23* betrachtet (Kirik *et al.*, 2005). Des Weiteren wurden die Promotoren von *GL2* und des homologen Gens *AtML1* bei dem Vergleich hinzugezogen, die in der Lage waren mit der *GL1*-cDNA den *gll* Hintergrund zu retten (s. 2.3.17, Esch *et al.*, 2003). Die cis-regulatorischen Elemente der hier analysierten 5'- und 3'-Bereiche von *WER* und *GL1* wurden in Tab. 17 kombiniert betrachtet, da sie in der Regulation vermutlich auch kombinatorisch wirken. Für den Promotor von *AtMYB23* wurde der Bereich von -1 bis -2000, für *GL2* der hier benutzte Bereich von -2132 bis -28 und für *AtML1*

der Bereich von –2000 bis –275 analysiert (der benutzte Bereich ist größer, aber zur Vergleichbarkeit mit den anderen Promotoren wurde hier diese Länge des Promotors benutzt.).

Man fand in allen hier untersuchten Promotoren Elemente die im Zusammenhang mit der Regulation durch die Phytohormone ABA, GA und Auxin stehen. Eine mögliche Verbindung zu Ethylen-vermittelter Regulation fand man nur für *WER*, *GL2* und *AtML1*, und zu Jasmonat nur für *GL1*. Viele Elemente die für Regulation über Pathogen-Abwehr sprechen, konnten in allen Genen gefunden werden. Ebenso konnten oft Hinweise auf circadiane Expression und Steuerung durch Licht, Phytochrom, Trockenstress und Hypomalarität identifiziert werden. Eine Verbindung zu Phosphatmangel vermittelter Regulation konnte nur für *WER* und *GL2* lokalisiert werden. Niedrigtemperatur-Regulation könnte für *GL1* und *WER* in Frage kommen.

In allen Promotoren wurden bZIP-Bindungsstellen (ABREATERD1, ACGTABOX, ACGTATERD1), Bindungsstellen für einen andern Typ-bZIP-Faktor AtDPBFs (wie ABI5, DPBFCOREDCDC3), MADS-Box-Bindungsstellen (CARGCW8GAT), verschiedene Typen von MYB-Bindungsstellen (IBOXCORE, MYBCORE, MYBST1) und MYC-Bindungsstellen (MYCATRD22, MYCERD1, MYCCONSENSUSAT), eine RAV1-Bindungsstelle (RAV1AAT), ein plastidiäres Element (S1FBOXSORPS1L21), eine spezifische DOF-Bindungsstelle (TAAAGSTKST1), WRKY-Bindungsstellen, sowie eine MARTBOX und das Element NAPINMOTIFBN identifiziert.

Ein weiterer Aspekt waren die Unterschiede zwischen den Promotoren von *GL1* und *WER*, da sie in unterschiedlichen Geweben, d.h. der Blattepidermis respektive der Wurzelepidermis, aktiv sind. Damit besaß *GL1* gemeinsam mit den anderen Genen außer *WER* die Elemente CAREOSREP1, CATATGGMSAUR, CCA1ATLHCB1 und CTRMCAMMV35S. Einzig im *GL1*-Promotor ließen sich die Elemente AACACOREOSGLUB1, ATHB1ATCONSENSUS, CELLCYCLES, CGACGOSAMY3, GARE2OSREP1, PROLAMINBOXOSGLUB1, QARBNEXTA, RGATAOS und T/GBOXATPIN2 identifizieren.

Hingegen teilte *WER* mit den anderen Promotoren außer mit *GL1* die Elemente AMYBOX2, CANBNNAPA, ELRECOREPCR1, MYBPLANT, MYBPZM, P1BS, PYRIMIDINE-BOXOSRAMY1A, RBCSCONSENSUS, RYREPEATBNNAPA, TATCCAOSAMY und WUSATAg. Der *WER*-Promotor alleine besaß die Elemente ERELEE4, HDZIPATATHB2, MYBATRD22 und TGTCACACMCUCUMISIN.

Tabelle 17: Anzahl und Vergleich der cis-regulatorischen Elemente der regulatorischen Bereiche der Gene *WER*, *GL1*, *AtMYB23*, *GL2* und *AtML1*

Die Farbkodierung der Zellen spiegelt wieder, in wie vielen der fünf Fragmente ein spezifisches Element auftritt (fünf, vier, drei, zwei).

Funktionale Kategorie	Cis-Element	5'-WER (-2026 bis -162)	3'-WER (1084 bis 2145)	5'-GL1 (-1380 bis -1)	3'-GL1 (2407 bis 2922)	5'-MYB23 (-2000 bis -1)	5'-GL2 (-2132 bis -28)	5'-AtML1 (-2000 bis -275)
ABA	ABRELATERD1	3	-	2	1	1	1	1
ABA	ACGTATERD1	5	3	6	4	5	8	3
ABA	CACGTGMOTIF (G-BOX)	1	-	1	-	-	-	-
ABA	DPBFCOREDCDC3	3	1	1	1	5	3	1
ABA	MYB1AT	4	-	3	3	3	-	4
ABA	MYB2CONSENSUSAT	1	2	3	-	2	5	-
ABA	MYCATERD1/ MYCATRD22	3	-	-	2	2	2	1
Abwehr	ELRECOREPCRPI	-	1	-	-	-	2	2
Abwehr	SEBFCONSSTPR10A	1	1	1	-	1	1	-
Abwehr	SP8BFIBSP8BIB	2	-	2	-	2	-	-
Abwehr	W-BOX	12	6	6	3	10	11	9
Auxin	ARFAT	1	-	2	-	1	2	-
Auxin	CATATGGMASUR	-	-	1	1	3	1	1
Circadian	CIACADIANLELHC	5	1	1	-	2	1	2
Ethylen	ERELEE4	1	-	-	-	-	5	1
GA	AMYBOX1	1	3	1	1	-	-	-
GA	AMYBOX2	1	-	-	-	2	-	1
GA	CAREOSREP1	-	-	-	1	1	2	-
GA	GARE2OSREP1	-	-	1	-	-	-	-
GA	GAREAT, MYBGHIV	1	3	2	1	1	-	-
GA	PYRIMIDINEBOXHVEPB1	1	-	-	1	-	-	-
GA	PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	-	1	-	-	3	3	2
Hypoosmolarität	PREATPRODH	1	-	2	1	1	1	1
Jasmonat	T/GBOXATPIN2	-	-	1	-	-	-	-
Licht	IBOXCORE	5	2	4	-	6	6	4
Licht	TBOXATGAPB	3	1	4	1	3	-	1
Licht, SA	GT1CONSENSUS	17	8	9	3	19	16	12
Niedrigtemperatur	LTRE1HVBLT49	4	-	2	-	-	-	-
Phosphatmangel	P1BS	-	1	-	-	-	1	-
Phytochrom	REALPHALGLHCB21	1	2	2	-	4	-	1
Trockenstress	MYB2AT	1	1	2	-	1	2	-
Trockenstress	MYBATRD22	1	-	-	-	-	-	-
Zellzyklus	CELLCYCLESC	-	-	1	-	-	-	-
	AACACOREOSGLUB1	-	-	1	-	2	-	-
	ACGTABOX	1	1	3	2	1	4	2
	ATHBIATCONSENSUS	-	-	-	1	-	-	-
	BOXIINTPATPB	2	1	3	1	3	-	3
	CANBNNA	1	1	-	-	-	-	1
	CARGCW8GAT	4	3	4	2	5	5	3
	CCA1ATLHCB1	-	-	-	1	2	-	1
	CGACGOSAMY3	-	-	-	1	-	-	1
	CONSERVED11NTZMATP1	-	-	1	-	-	-	-
	CTRMCAV35S	-	-	1	-	37	11	1
	HDZIPATATHB2	1	-	-	-	-	-	-
	MARTBOX	-	1	1	-	3	3	1
	MYBILEPR	1	1	1	-	2	1	-
	MYBCORE	2	3	5	-	3	8	2
	MYBPLANT	-	1	-	-	1	-	1
	MYBPZM	-	1	-	-	-	2	1
	MYBST1	1	1	1	-	6	5	3
	MYCCONSUSAT	4	-	4	4	7	9	3
	EBOXNNA	-	-	-	-	-	-	-
	NAPINMOTIFBN	1	1	-	1	1	3	2
	PROLAMINBOXOSGLUB1	-	-	-	1	-	-	-
	QARBNEXTA	-	-	1	-	-	-	-
	QELEMENTZM3	-	-	-	-	-	1	2
	RAVIAAT	4	6	2	3	6	8	2

	RBCSCONSENSUS	1	1	-	-	-	-	4
	RGATAOS	-	-	1	-	-	-	-
	RYREPEATBNNAPA	-	1	-	-	1	1	3
	S1FBOXSORPS1L21	1	-	1	-	2	1	2
	TAAAGSTKST1	2	1	2	-	7	9	2
	TATCCAOSAMY	2	2	-	-	2	1	1
	TGTCACACMCUCUMISIN	1	1	-	-	-	-	-
	WUSATAg	1	-	-	-	-	-	3

2.8 Versuche zur Isolation der Proteine der Musterbildungsgene

Für zukünftige Promotor-Bindungsstudien sollte die Isolation der regulatorischen Proteine der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung initiiert werden, um später die Untersuchungen zur Interaktion dieser Faktoren mit den Promotorregionen durchzuführen.

2.8.1 HIS-markierte Proteine in *E. coli*

Die Proteine der Musterbildung sollten über eine N-terminale, fünffach HIS-markierte Fusion aus Bakterien isoliert werden. Die Proteingrößen der untersuchten Proteine GL1, WER, AtMYB23, CPC, TRY, GL2, GL3 und TTG1 können der Tab. 18 entnommen werden.

Tabelle 18: Übersicht über die Größe der in *E. coli* exprimierten Fusionsproteine der Musterbildungsgene

Gen	Aminosäuren Ohne HIS-Fusion	Aminosäuren mit HIS-Fusion	Fusionsprotein (kDa)
<i>GL1</i>	228	258	28,6
<i>WER</i>	203	233	25,8
<i>AtMYB23</i>	219	249	27,6
<i>CPC</i>	94	124	13,7
<i>TRY</i>	106	136	15,1
<i>GL2</i>	747	777	86,3
<i>GL3</i>	637	667	74,1
<i>TTG1</i>	342	372	41,3

Variationen in der IPTG-Konzentration und der Dauer der Induktion zeigten auf den denaturierenden Proteingelen, dass eine Induktion mit 1 mM IPTG für mindestens 5 Stunden gute Expressionsraten für AtMYB23, WER, CPC, TRY und TTG1 lieferte (s. Abb. 98A, B). Für die Proteine AtMYB23, WER, CPC und TRY konnten die entsprechenden Banden des exprimierten Proteins auf der SDS-PAGE identifiziert werden, die der Größe des zugehörigen Proteins entsprachen (Abb. 98A). Für das TTG1-Protein konnte eine starke Proteinbande unterhalb der 40 kDa und eine schwächere Bande bei ca. 35 kDa identifiziert werden (Abb. 113B), dies entsprach nicht der hier erwarteten Größe von 41 kDa. Die Immunodetektion mit einem spezifischen Antikörper gegen das HIS-Markierung zeigte eine Bande bei ungefähr 35 kDa auf dem Western-Blot, die evtl. der schwächeren Bande der SDS-PAGE entsprechen könnte, und mehrere, kleinere Banden (Abb. 113C). Bisher war es nicht möglich, die Expression der Proteine GL1, GL2 und GL3 in *E. coli* (BL21DE3) auf der SDS-PAGE sichtbar zu machen.

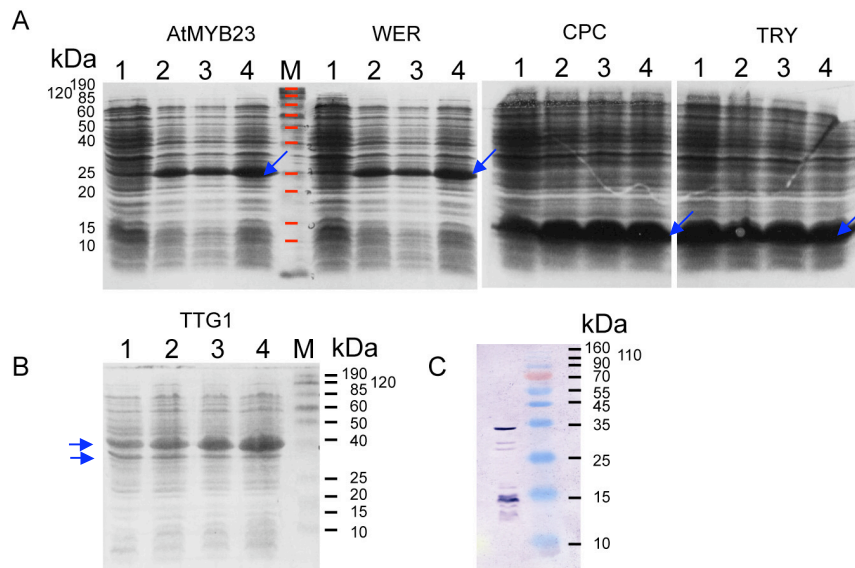


Abbildung 113: SDS-PAGE und Western-Blot der in *E. coli* exprimierten Proteine AtMYB23, WER, CPC, TRY und TTG1

A) SDS-PAGE: Gesamter Extrakt der Bakterien (10µl), die die Plasmide AtMYB23-, WER-, CPC- bzw. TRY-pDEST-17 tragen. Dabei wurde nicht mit IPTG (1), mit 0,4 mM IPTG (2), mit 0,7 mM IPTG (3) und 1 mM IPTG (4) für 1,5h bei 37°C induziert.

B) SDS-PAGE: Gesamter Extrakt der Bakterien (5µl), die das Plasmide TTG1-pDEST-17 tragen. Dabei wurde 1 mM IPTG für 0h (1), 2h (2), 3,5h (3) und 5h (4) bei 37°C induziert.

C) Western-Blot mit anschließender HIS-Antikörper-Detektion: Gesamter Extrakte der Bakterien (5µl), die das Plasmid TTG1-pDEST-17 trägt. Dabei wurde mit 1 mM IPTG für 5h bei 37°C induziert.

Die Proteingröße kann dem aufgetragenen Marker (M) und den nebenstehenden kDa-Angaben entnommen werden. Die blauen Pfeile markieren die mutmaßlichen, überexprimierten Proteine.

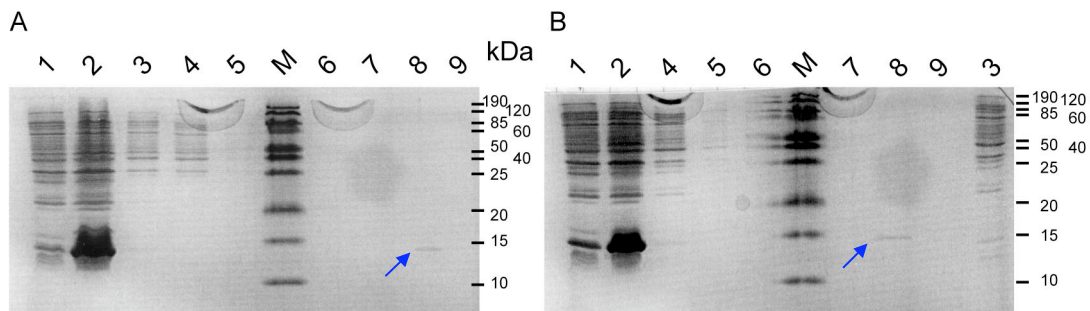


Abbildung 114: SDS-PAGE in *E. coli* exprimierten Proteine CPC und TRY nach Reinigung über Ni-NTA-Agarose

SDS-PAGE der Proteinextrakt und Eluate der verschiedenen Reinigungsschritte nach Bindung an die Ni-NTA-Agarose: In A) Reinigung des Extraktes der Bakterien mit dem Plasmide CPC-pDEST-17 und in B) mit dem Plasmid TRY-pDEST-17. Dabei wurde mit 1 mM IPTG für 5h bei 37°C induziert. (1) Bakterienextrakt ohne IPTG, (2) Bakterienextrakt mit IPTG-Induktion, (3) Extrakt nach dem Aufschluss, (4) Eluat von Puffer1, (5) Eluat von Puffer2 (8 mM Imidazol), (6) Eluat von Puffer3 (15 mM Imidazol), (7) Eluat von Puffer4 (35 mM Imidazol), (8) Eluat von Puffer5 (150 mM Imidazol) und (9) Eluat von Puffer6 (250 mM Imidazol). In (1) und (2) wurden je 5 µl und (3) bis (9) je 10µl Probenvolumen aufgetragen.

Anschließend wurde versucht, die Proteine von AtMYB23, WER, CPC und TRY durch Ni-NTA-Agarose zu reinigen. Dabei konnten bisher nur die sehr stark exprimierten Proteine CPC und TRY mit einer Konzentration von 150 mM Imidazol von der Ni-NTA Matrix eluiert und von den anderen Proteinen isoliert werden (Abb. 114A, B).

2.8.2 Versuche zur Detektion HA-fusionierter Proteine der Musterbildungsgene in *Arabidopsis thaliana*

Die Proteine der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung sollten auch aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Aus diesem Grund wurden zunächst die transgenen Pflanzen hergestellt, die die Musterbildungsgene ektopisch unter dem CaMV-35S-Promotor exprimieren und eine C-terminale Fusion mit dem Dreifachepitop für Hemagglutinin (HA) besitzen. Die untersuchten Gene können Tab. 19 entnommen werden.

Die T1-Pflanzen wurden, sofern sie einen Phänotyp für ektopische Expression lieferten, vorselektiert. So konnten für die *TRY* und *CPC*-Konstrukte T1-Pflanzen in *Ler*-Hintergrund mit nackten Rosettenblättern und für *GL3* T1-Pflanzen mit einer erhöhten Anzahl von Trichomen auf den Rosettenblättern identifiziert werden. Für *GL2* konnten nur wenige T1-Pflanzen selektiert werden, die außerdem zerknüllte Blätter aufwiesen (ohne Abb.). Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Phänotypen (Ohashi *et al.*, 2002; Payne *et al.*, 2000; Schellmann *et al.*, 2002). Für *GL1* und *TTG1* wurden die entsprechenden 35S-Konstrukte zusätzlich zum Wildtyp *Ler* in die vollständig nackten Funktionsverlust-Mutanten *gll-1* bzw. *ttg1-13* transformiert. Dabei zeigte sich für *GL1* in einigen T1-Pflanzen die Initiation von wenigen Trichomen, die für den 35S-Promotor charakteristisch ist (s. 2.3.3). Das *TTG1*-Konstrukt zeigte eine sehr gute Rettung des *ttg1-13* Hintergrunds (Bouyer, 2004). Die 35S-HA-Fusion für *AtMYB23*, *WER*, *GL1* und *TTG1* in *Ler* Hintergrund zeigten in den Rosettenblättern keine auffälligen Veränderungen gegenüber dem Wildtyp *Ler*.

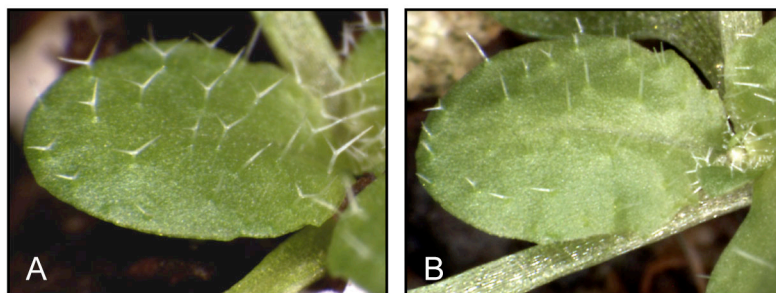


Abbildung 115: Phänotyp der 35S::TTG2 *ttg2-1* im Vergleich zu *ttg2-1* Pflanzen

Vergleich des Phänotyps des fünften Rosettenblattes 21 Tage alter Pflanzen von A) 35S::TTG2::HA *ttg2-1* und B) *ttg2-1*.

Das Konstrukt 35S::TTG2::HA wurde in *Ler* und *ttg2-1* Hintergrund transformiert, da das 35S-Konstrukt von *TTG2* bisher nicht charakterisiert wurde. Der Phänotyp der *ttg2-1* Funktionsverlust-Mutante konnte durch die ubiquitäre Überexpression von *TTG2* nur partiell gerettet werden. Die Trichome in der *ttg2* Mutante sind größtenteils nur rudimentär bzw. unterverzweigt (Johnson *et al.*, 2002), während auf den Rosettenblättern der T1-Pflanzen hauptsächlich zwei-verzweigte Trichome zu finden waren (Abb. 115). Im wildtypischen Hintergrund *Ler* konnte keine Veränderung des

Phänotyps durch 35S::TTG2::HA festgestellt werden, d.h. die Trichomanzahl und der Verzweigungsgrad wurde nicht geändert.

Da der Phänotyp der transformierten Pflanzen auf die Expression der HA-markierte Proteine schließen ließ, wurden jeweils sieben Linien des jeweiligen transformierten Konstrukts durch Western-Blot und anschließende Immunodetektion mit dem spezifischen HA-Antikörper analysiert.

Tabelle 19: Übersicht über die Größe der in *Arabidopsis* überexprimierten Fusionsproteine der Musterbildungsgene

Gen	Aminosäuren	Aminosäuren mit HA-Fusion	Fusionsprotein (kDa)
<i>GL1</i>	228	275	30,5
<i>WER</i>	203	250	27,7
<i>AtMYB23</i>	219	266	29,5
<i>CPC</i>	94	141	15,6
<i>TRY</i>	106	153	17,0
<i>GL2</i>	747	794	88,2
<i>GL3</i>	637	684	76,0
<i>TTG1</i>	342	388	43,1
<i>TTG2</i>	349	396	44,0

Für die Proteine AtMYB23, TRY, CPC und TTG1 konnten klare Banden identifiziert werden. Der Vergleich der Größen der Banden mit den erwarteten Proteingrößen (vgl. Tab. 19 mit Abb. 116) zeigte für alle hier detektierten Proteine höhere Werte. Für AtMYB23 fand sich eine spezifische Bande bei 35 kDa (Abb. 116A) und für TRY und CPC eine Bande unterhalb von 25 kDa (Abb. 116B, C), wobei die CPC-Bande etwas kleiner war. Die erwarteten Größen waren 29,5 kDa für AtMYB23 und 17,0 bzw. 15,6 kDa für TRY und CPC (Tab. 19). Für TTG1 konnte eine sehr starke Bande bei 55 kDa identifiziert werden (Abb. 116D). Diese lag genau an der Stelle, an der in allen Analysen eine schwache Bande festgestellt werden konnte, die der RuBisCO-Bande entspricht. Die Größe sollte aber bei 43,1 kDa vorzufinden sein. Für GL1 war eine Detektion für einen Proteinextrakt aus Rosettenblättern nicht möglich. Beschränkte sich das benutzte Pflanzengewebe auf die apikale Meristemregion, d.h. Sprossapikalmeristem mit den schützenden Blattprimordien und jüngsten, anliegenden Blättern, so konnte eine schwache Bande bei 35 kDa und eine stärkere Bande bei 15 kDa, sowie mehrere feine Banden zwischen den zwei gut sichtbaren Banden identifiziert werden (Abb. 116E), was auf Proteinabbau hindeuten könnte. Die erwartete Größe des Proteins ist aber 30,5 kDa.

Für die Proteine GL2, GL3 und WER konnte bisher keine spezifische Bande auf dem Western-Blot analysiert werden, und für TTG2 steht die Analyse zurzeit noch aus.

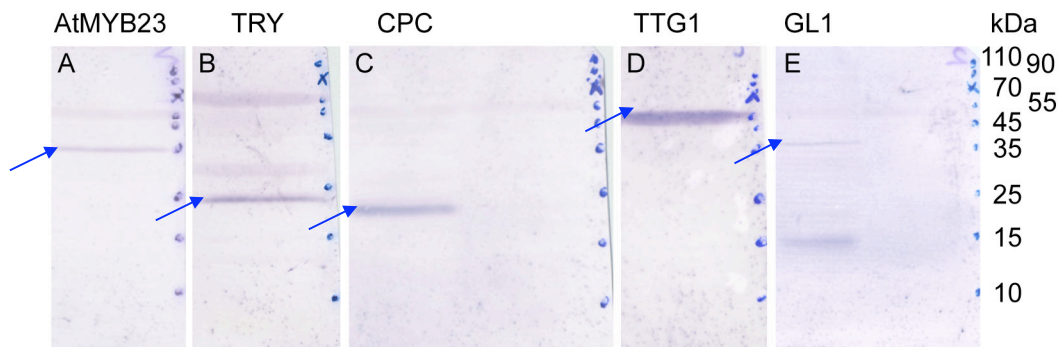


Abbildung 116: Western-Blot der HA-markierte Proteine der Musterbildungsgene *AtMYB23*, *TRY*, *CPC*, *TTG1* und *GL1* aus *Arabidopsis*

Ein Gesamtproteinextrakt der transgenen *Ler* Pflanzen, die die Musterbildungsgene A) *AtMYB23*, B) *TRY*, C) *CPC*, D) *TTG* und E) *GL1* unter dem 35S-Promotors mit der C-terminale Fusion für das Dreifachepitop von Hemagglutinin enthalten, wurde hergestellt. Dabei wurden 25 µg Gesamtprotein auf die SDS-PAGE aufgetragen. Für *AtMYB23*, *TRY*, *CPC* und *TTG1* wurde der Proteinrohextrakt aus mehrere Tage alten Rosettenblättern und für *GL1* aus dem Sprossmeristemen mit anliegenden, jungen Blättern hergestellt. Die anschließende Immunodetektion erfolgte mit dem HA-Antikörper. Nebenstehen ist die Größenzuweisung der Proteinleiter zu finden. Auf jedem Blot sind die Banden des Markers durch Punkte dargestellt. Die blauen Pfeile markieren die mutmaßlichen Banden der überexprimierten Proteine.

3. DISKUSSION

Die epidermale Musterbildung der Trichome und Wurzelhaare ist ein komplexer Prozess, der maßgeblich von dem Zusammenspiel der Aktivatoren und Inhibitoren des jeweiligen Zellschicksals abhängt. In der vorliegenden Arbeit brachte die Untersuchung und der Vergleich der transkriptionellen Regulation der Aktivatoren *GLI* und *WER* sowie der Inhibitoren *TRY* und *CPC* neue Erkenntnisse über grundlegende Zusammenhänge der Musterbildung. Außerdem konnten Einblicke darüber gewonnen werden, welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Regulation der homologen Gene *GLI* und *WER* sowie *TRY* und *CPC* existieren.

Zu diesem Zweck wurden die bereits veröffentlichten Promotorregionen als Startpunkt gewählt, um die spezifischen, regulatorischen Domänen zu finden, die das komplexe Expressionsprofil dieser Gene liefern. Zu Beginn der Arbeit waren die regulatorischen Bereiche für *GLI* auf eine 5'-untranslatierte Sequenz von 1,4 kb mit einer zusätzlichen 3'-Enhancer-Region von ungefähr 500 Nukleotiden ca. 800 Nukleotide hinter der Polyadenylierungsstelle beschrieben (Larkin *et al.*, 1993; Oppenheimer *et al.*, 1991). Für *WER* wurde eine Komplementierung und GUS-Reporter-Analyse mit 4 kb 5'- und 1.1 kb 3'-Sequenz von Lee und Schiefelbein (1999) durchgeführt. Für die Analyse der GUS-Expression des *TRY*-Gens wurde eine 5'-untranslatierte Sequenz von 1,4 kb (Schellmann *et al.*, 2002) und für die Komplementation von *CPC* eine 5'-Sequenz von ca. 500 und 3'-Sequenz ca. 300 Nukleotiden benutzt (Wada *et al.*, 1997).

3.1 Kritische Betrachtung der experimentellen Untersuchungen

3.1.1 Der Expressionsvektor *PARB*

Zur Untersuchung der Promotoren wurde nicht die oft gewählte Strategie der progressiven Promotordeletionen ausgehend vom distalen Ende des Promotors gewählt, da die Basis der hier durchgeführten Promotoruntersuchungen die Theorie des modulären Aufbaus der regulatorischen Sequenzen darstellt (Davidson, 2001). Stattdessen wurde die jeweils zu untersuchende, regulatorische Sequenz in überlappende Bereiche unterteilt, um möglichst alle Module des regulatorischen Gesamtsystems zu erfassen.

Die experimentelle Analyse der regulatorischen Bereiche beruhte auf zwei verschiedenen Ansätzen: Zum einen auf der GUS-Reporter-Analyse und zum anderen auf der Untersuchung zur Fähigkeit der Rettung der Musterbildung in den verschiedenen, zugehörigen Funktionsverlust-Mutanten. Diese Unterscheidung war notwendig, da die GUS-Analyse nur eine einseitige Information über die Expression lieferte, die keine Aussage über die Funktionalität beinhaltete. Gerade innerhalb des hier untersuchten Musterbildungssystems spielen aber feine Unterschiede auf zeitlicher und räumlicher Ebene eine Rolle. In zahlreichen Beispielen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass räumlich

und zeitlich kaum oder nicht auflösbare Unterschiede im GUS-Expressionsmuster sehr deutliche Unterschiede in der Rettungskompetenz aufweisen konnten. Andererseits konnten Bereiche, die inhibitorische Funktion besaßen, erst durch Rettungsanalysen eindeutig als solche charakterisiert werden, da eine verminderte GUS-Aktivität nicht aussagekräftig genug war. Des Weiteren konnte für kleinste Fragmente eine Fähigkeit zur Rettung nachgewiesen werden, die jedoch keine sichtbare GUS-Expression verursachten.

Der binäre Vektor, der in die entsprechenden Pflanzen transformiert werden sollte, musste eine eigene Transkriptionsintiationsstelle besitzen, da die einzelnen Promotorfragmente nicht zwingend den Kernpromotor besitzen. Der entwickelte Vektor PARB besitzt einen essentiellen, eigenen Kernpromotor in Form des CaMV-35S-Minimalpromotors mit der TATA-Box von -46 bis +8. Dieser Kernpromotor weist allein keine GUS-Expression in Pflanzen auf (Benfey und Chua, 1990b) und wird häufig zur Untersuchungen von Promotorfragmenten benutzt (Feldbrügge *et al.*, 1997; Rushton *et al.*, 2002; Santi *et al.*, 2003).

Wie in den Ergebnissen gezeigt werden konnte, verursachte der Vektor PARB eine Verstärkung der Expression, wie z.B. die GUS-Expression des 5'-Promotors in Kombination mit dem 3'-Enhancer von *GLI* gegenüber der bereits gezeigten Expression bei Larkin *et al.* (1993) vermuten lässt. Die nachgewiesene Verstärkung der beiden Rekombinationsstellen mit einer 65 Nukleotide langen Puffersequenz und Minimalpromotor unterstützt diese Beobachtung. Diese Verstärkung könnte zum einen auf einer transkriptionell verstärkenden Funktion des Vektors und zum anderen auf einer hohen Insertionsrate beruhen. Die erste Erklärung kann nur auf die zusätzliche Sequenz der attB2-Stelle nach der Rekombination des Promotorfragments oder den zusätzlichen Minimalpromotor zurückgeführt werden, was ungeklärt bleibt. Diese Verstärkung ermöglicht Färbung in Geweben/Zellen, die mit anderen Vektoren zu schwach zur Visualisierung der GUS-Expression ist.

Die generelle Verstärkung der GUS-Expression ist akzeptabel, da kein Einfluss auf die spezifische Lokalisierung festgestellt werden konnte. Außerdem wurden für die Rettungsuntersuchungen relative Vergleiche der Rettungseffizienzen der einzelnen Konstrukte unternommen, so dass auch für alle Konstrukte das gleiche Ausmaß an Verstärkung vorliegt. Viel mehr ermöglichte die generelle Verstärkung der Expression, dass regulatorische Sequenzen identifiziert werden konnten, die Information für die Lokalisierung der Expression tragen, deren Stärke allein nicht ausreichte, die Expression im GUS-Assay sichtbar zu machen. Aus diesem Grund konnte auf die vielfach genutzten, artifiziellen Fragmentmultimere für Expressionsstudien verzichtet werden (Bäurle und Laux, 2005; Guo *et al.*, 2004; Koshino-Kimura *et al.*, 2005).

3.1.2 *Variationsbreite der transgenen Linien eines Konstruktes*

Ein ernstzunehmendes Problem war die große Variation unter den unabhängigen, transgenen Linien eines Konstruktes. Dies lag entgegen der ursprünglichen Annahme nicht an dem Vektor PARB, da auch der bereits publizierte Vektor pGGE4 bei den eigenen Transformationen diese hohe Variationsbreite aufwies. Für z.B. den 35S-Promotor oder Untersuchungen des *AtHsp90-1*-Promotors wurden diese Unterschiede ebenfalls beschrieben (Fang *et al.*, 1989; Haralampidis *et al.*, 2002). Es handelt sich also um ein generelles Problem. Wahrscheinlich kann die Variation zum einen auf eine variierende Insertionsrate zurückgeführt werden. Exemplarische Southern-Blots zeigten bis zu fünf Kopien in den transgenen Linien einer Pflanzentransformation. Zum anderen können auch die verschiedenen, chromosomalen Insertionsorte Ursache sein. Wie eine Studie demonstrierte, ist gerade die Insertionsrate in 5'-Regionen vor einem Gen überrepräsentiert (Forsbach *et al.*, 2003), so dass zusätzliche cis-regulatorische Einflüsse anderer, genomischer Bereiche auf die Transkription der T-DNA nicht ausgeschlossen werden können und sich folglich auch Einzelinsertionslinien eines Transgens unterscheiden können.

Für die GUS-Analysen wurde aus diesem Grunde für jedes Konstrukt eine Vielzahl von transgenen Linien in der T2-Generation untersucht und in starke und schwache Linien kategorisiert. Dies ermöglichte einen umfassenden Einblick über die Variationsbreite, so dass abgesichert war, dass die starken Linien eine Verstärkung der schwachen Linien darstellten und das maximale Expressionsniveau repräsentierten. Bei Konstrukten, die eine sehr intensive Expression lieferten, konnte immer in allen Linien Färbung detektiert werden. Bei Konstrukten mit schwacher Expression war allerdings das Vorkommen von ungefärbten Linien Teil der phänotypischen Variationsbreite, und diente als weiteres Maß für den Vergleich der Expressionsstärke. Damit wurde also für alle Transgene immer ein relativer Vergleich von starken zu schwachen Linien ermöglicht und folglich eine Vergleichbarkeit unter den einzelnen Transgenen ermöglicht. Dokumentiert wurde nur das jeweils stärkste Expressionsmuster einer Linie.

Dasselbe Problem ergab sich bei der Rettungsanalyse: Wie entscheidet man in einer stark variierenden Population von geretteten T1-Pflanzen, in der bestimmte Pflanzen keine Trichome und andere 30 Trichome auf dem vierten Rosettenblatt tragen, welche die „richtige“ transgenspezifische Rettung wiedergibt? Für die Rettungsanalysen wurde deshalb ebenfalls auf eine Vielzahl von transgenen Linien zurückgegriffen. Es wurden die T1-Pflanzen untersucht, um heterozygote Effekte zu vermeiden, und wenn die Transformationseffizienz dies zuließ, wurden möglichst über hundert T1-Pflanzen gezählt. Wichtig war die Erkenntnis, dass neben der maximal zu erreichenden Trichomzahl auch die Verteilung der Trichomanzahlen über die T1-Pflanzen auf jeweils dem Rosettenblättern 1, 2, 3 oder 4 und damit auch der Anteil der gänzlich ungeretteten T1-Pflanzen eine wichtige Aussage über die Rettungseffizienz eines Konstruktes lieferte. Eine simple

Auswertung, beispielsweise durch Mittelwert und Standardabweichung, ergab keinen Aufschluss, da die Standardabweichungen in der Regel sehr groß sind und die Rettungstendenz nicht zu erkennen ist. Deshalb musste ein genaues, graphisches Muster, welches die Verteilung der Trichomzahlen über die Gesamtheit der T1-Pflanzen zur Grundlage hat, hinzugezogen werden.

3.1.3 *Versuche zur Proteinüberexpression der Musterbildungsfaktoren*

Wie die Analyse der Proteinextrakte von Bakterien, die die Proteine AtMYB23, WER, CPC und TRY exprimieren, zeigte, konnte eine Proteinbande in der entsprechenden Größe auf dem denaturierenden Proteingel nachgewiesen werden. Für die Proteine GL1, GL2 und GL3 war dies bisher nicht möglich. Dies könnte für einen starken Abbau in Bakterien sprechen. Bisher wurden nur die Proteine WER und CPC in Bakterien überexprimiert (Koshino-Kimura *et al.*, 2005), sowie der N-Terminus von GL2 mit der DNA-Bindungsdomäne (Ohashi *et al.*, 2003), so dass die bakteriellen Expressionsprobleme mit den anderen Proteinen zurzeit nicht beurteilt werden können. Für bHLH-Proteine ist aber eine bakterielle Expression grundsätzlich schwierig (persönliche Mitteilung von Joachim Uhrig). Für TTG1 konnte ebenfalls eine Proteinbande identifiziert werden, die aber nicht die Größe von 41 kDa erreichte. Auf dem entsprechenden Western-Blot mit HIS-Markierung-spezifischem Antikörper konnte ebenfalls eine Bande vom 35 kDa identifiziert werden, so wie mehrere, kleinere Banden, womit sich die Frage stellt, ob TTG posttranslational partiell degradiert wird. Da in Bakterien CPC und TRY gegenüber WER und AtMYB23 sehr viel stärker exprimiert wurden, konnten die ersten Untersuchungen zur Isolation über Ni-NTA-Agarose nur für CPC und TRY erfolgreich durchgeführt werden. Für WER und AtMYB23 war dies bisher nicht möglich, da aufgrund erheblicher Verluste während der Isolationsprozedur eine große Menge von überexprimierten Protein für die Isolation benötigt wird.

Die Überexpression der Proteine mit HA-Markierung in Pflanzen ergab die entsprechenden Überexpressionsphänotypen im Wildtyp bzw. in den entsprechenden Funktionsverlust Mutanten, so dass man davon ausgehen kann, dass funktionale Proteine synthetisiert wurden. In Pflanzenrohextrakt konnten für AtMYB23, TRY, CPC und TTG1 in verschiedenen Linien Proteinbanden auf dem Immunoblot mit HA-Antikörper nachgewiesen werden. Für TTG1 lokalisierte diese Bande in der RuBisCO-Bande, die auch im Proteinrohextrakt des Wildtyps schwach detektiert wurde. Da aber eine extreme Verstärkung gegenüber den anderen Proben festgestellt werden konnte, die die dieselbe Gesamtproteinmenge trugen, sollte die detektierte Bande bei dem 35S::TTG1-Rohextrakt spezifisch für TTG1 sein. Für GL1 konnte in dem Rohextrakt aus Rosettenblättern keine Proteinbande detektiert werden. Erst ein Extrakt aus der Meristemregion mit den jungen Blattprimordien ermöglichte die Detektion einer schwachen Bande und vieler, kleinerer Banden. Dies spricht für eine starke Degradation des GL1-Proteins, die in den

auswachsenden Rosettenblättern überwiegt, aber in Blattprimordien schwächer ist. Erklärt werden könnte dies durch die Aktivatorrolle von GL1 in der Trichom-Musterbildung, wodurch eine schnelle Elimination des Proteins aus Geweben gewährleistet werden muss, in denen die Musterbildung bereits abgeschlossen ist und das *GL1*-Gen nicht mehr exprimiert wird. Möglicherweise werden die Proteine GL1 oder/ und GL3 durch die E3-HECT-Ligase KAKTUS (KAK oder UPL3) über den Ubiquitinylierungsweg abgebaut (Downes *et al.*, 2003; El Refy *et al.*, 2003). Für WER konnte ebenfalls in Rosettenblättern kein Protein nachgewiesen werden. Auch hier sollte man sich auf das Wurzel- und Sprossapikalmeristem mit umliegenden Blattprimordien für den Proteinrohextrakt konzentrieren, da es als homologes Protein demselben Proteinabbauweg wie GL1 unterliegen könnte.

Grundsätzlich waren die Proteinbanden auf dem Western-Blot immer um ca. 10 bis 15 kDa zu groß. Dies könnte zum einen an dem verwendeten Auftragungspuffer liegen, der eine Verschiebung gegenüber dem Marker verursachte. Zur Kontrolle sollten Proben und Marker mit demselben Puffer aufgetragen werden. Möglicherweise spricht die Bandenverschiebung aber auch für posttranslationale Modifikationen der regulatorischen Proteine *in Planta*, wie z.B. durch Sumoylierung (ca. 14 kDa) oder Ubiquitinylierung (9k Da) (Kurepa *et al.*, 2003; Melchior, 2000). Sumoylierung steht im Zusammenhang mit der Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, während die Ubiquitinylierung für einen regulierten Proteinabbau durch das 26S-Proteasom sprechen würde (Gill, 2005; Melchior, 2000). Eine Überprüfung der Proteine durch Massenspektroskopie und Proteinsequenzierung wäre folglich empfehlenswert, um zu klären, in welcher Form die Proteine in der Pflanze vorliegen.

3.2 Das regulatorische System von *GLABRA1* und *WEREWOLF* im Vergleich

GL1 und *WER* kodieren für homologe Proteine, die austauschbar sind (Lee und Schiefelbein, 2001; Lee und Schiefelbein, 1999), und sie besitzen vergleichbare Funktionen in der Trichom- und Wurzelhaar-Musterbildung. Ob ihre regulatorischen Bereiche Ähnlichkeiten aufweisen, ist bisher nicht bekannt, konnte aber anhand der hier identifizierten, regulatorischen Regionen geklärt werden.

3.2.1 Der 5'-Promotor von *GL1* besitzt gewebespezifische, regulatorische Information

Das Expressionsprofil von *GL1* wird, wie GUS-Expressionsstudien und Rettungsanalysen hier gezeigt haben, durch 5'-Promotor und 3'-Enhancer gemeinsam reguliert. Dabei liefert die Kombination aller hier identifizierten Module die beste Expression, um das Trichom-Muster in der *gl1*-Funktionsverlust Mutante wiederherzustellen (s. Abb. 34 und Abb. 48).

Der 5'-Promotor des *GL1*-Gens zeigte entgegen den von Oppenheimer *et al.* (1991) veröffentlichten Daten nicht nur die GUS-Expression in den Stipeln, sondern auch die durch *in Situ*-Analyse demonstrierte (Oppenheimer *et al.*, 1991), *GL1*-typische Expression in Rosettenblättern und Trichomen. Der 5'-Promotor mit der 5'-UTR war außerdem in der Lage eine schwache, partielle Rettung der *gll* Mutante zu erzeugen (s. Abb. 29). Die Diskrepanz zwischen den eigenen und den publizierten Daten beruht, wie gezeigt wurde, nicht auf Ökotypen-Unterschieden in der DNA und dem Hintergrund zwischen Col und *Ler*. Erklärung kann zum einen die Verstärkung durch den hier benutzten Grundgerüst-Vektor PARB mit dem exogenen CaMV-35S-Minimalpromotor im Gegensatz zum, bei Oppenheimer *et al.* (1991) verwendeten Vektor pBI101.1 sein. Da das Plasmid GL1p/GUS (Oppenheimer *et al.*, 1991) nicht erhältlich war, konnte zur Überprüfung nur auf das direkt vergleichbare Plasmid pGGE4 (pGL1p/GUS mit 3'-Enhancer (Larkin *et al.*, 1993)) im selben Rückrat-Vektor pBI101.1 zurückgegriffen werden. Die erneute Transformation in Col Hintergrund bestätigte die Variationsbreite der GUS-Phänotypen, wenn viele Transformanten erhalten wurden. Das Auftreten der bisher nicht beschriebenen, ausschließlich stipulärer Expression in schwachen Linien für pGGE4 macht die Erklärung plausibel, dass die damalige Agrobakterien-Transformationsmethode von Wurzelexplantaten gegenüber der hier angewandten, floralen Tunkmethode eine niedrigere Transformationsrate zeigte (Clough und Bent, 1998), so dass die transkriptionelle und damit phänotypische Bandbreite eines Konstruktes in seiner Gesamtheit nicht erfasst wurde. In den damaligen Untersuchungen konnten nur drei transgene Linien für pGL1p/GUS und sechs Linien für pGGE4 erhalten werden, hingegen konnten bei den eigenen transformierten Pflanzen eine Vielzahl von transformierten Linien produziert werden, die ein breites Spektrum der GUS-Expression widerspiegeln.

3.2.2 Klassifizierung des historischen „3'-Enhancers“ als Enhancer mit gewebespezifischer Information

Erstaunlicher Weise konnte der bereits 1993 veröffentlichte 3'-Enhancer (Larkin *et al.*, 1993) des *GL1*-Gens in den hier durchgeführten Analysen autonome GUS-Expression unabhängig vom 5'-Promotor vermitteln. Die Orientierung und die Position dieser regulatorischen Sequenz beeinflusste die GUS-Expression nicht, da die Positionierung des Enhancers vor den 35S-Minimalpromotor und hinter dem nos-Terminator in jeweils beiden Orientierungen dasselbe Expressionsmuster lieferte. Damit sind die Kriterien für die Definition eines transkriptionellen Enhancers erfüllt (Banerji *et al.*, 1981). Da der Enhancer qualitative und quantitative regulatorische Information trägt kann er als eigenständiges, cis-regulatorisches Modul betrachtet werden.

Die Rettungsuntersuchungen des 3'-Enhancers zeigten allerdings eine Einschränkung gegenüber den GUS-Analysen, da die Rettungseffizienz des 3'-Enhancers in der 3'-Position schlechter ausfiel

als in der 5'-Position zur *GLI*-cDNA. Generell scheinen pflanzliche Enhancer die Expression im 3'-Bereich hinter einem Gen oft weniger gut dirigieren zu können als im 5'-Bereich (Chen *et al.*, 1988; Kay *et al.*, 1987; Stockhaus *et al.*, 1989). Dies könnte auf die Distanz des Enhancer zum eigentlichen Promotor zurückgeführt werden (Sandhu *et al.*, 1998). Die hier beobachtete Diskrepanz zwischen Rettungsversuchen und GUS-Untersuchungen könnte eventuell auf einer kürzeren Sequenz zwischen Minimalpromotor und 3'-positionierten Enhancer der Rettungskonstrukte gegenüber den GUS-Konstrukten basieren: Um eine Interaktion dieser beiden regulatorischen Regionen zu ermöglichen, muss die DNA eine Schleife (Loop) ausbilden, die es den bindenden Transkriptionsfaktoren und dem basalen Transkriptionsapparat (BTA) ermöglicht, miteinander in Kontakt zu treten. In den Rettungskonstrukten beträgt die für die Schleifenausbildung zur Verfügung stehende Sequenz nur 1013 Nukleotide durch die *GLI*-cDNA und den nos-Terminator, die im Gegensatz zu den GUS-Konstrukten (2168 Nukleotiden von GUS-Gen und Terminator) aufgrund der reduzierten Länge sterisch schwierig sein könnte. Im wildtypischen Gen beginnt der Enhancer ebenfalls erst 2407 Nukleotide nach dem endogenen Translationsstart, so dass auch hier eine große Schleife ausgebildet werden kann. Ist der Enhancer in 5'-Position lokalisiert, ist eine Interaktion wahrscheinlich ohne Schleifenbildung möglich, so dass die Problematik dort nicht auftritt.

Interessanter Weise spielte auch die Orientierung des Enhancers in 3'-Position in den Rettungskonstrukten eine Rolle, so dass die Interaktion der bindenden Faktoren des 3'-Enhancers mit dem BTA wahrscheinlich kaum möglich ist, wenn der 3'-Enhancer direkt hinter der *GLI*-cDNA in Vorwärtsorientierung positioniert ist. Dies spricht für eine entscheidende Bedeutung des proximalen Bereichs des Enhancers, der anscheinend nur in umgekehrter Orientierung für eine Interaktion mit dem Minimalpromotor über eine Schleife zugänglich ist, was durch die Unterteilung des 3'-Enhancers bestätigt wurde (s. Abb. 45 und Abb.48).

3.2.3 Synergistische Interaktion des 5'-Promotors und des 3'-Enhancers von *GLI*

Wie die Kombination von 5'-Promotor und 3'-Enhancer des *GLI*-Gens in 5'- sowohl wie in 3'-Position unabhängig von der Orientierung demonstrierte, konnte die Rettungseffizienz erheblich gesteigert werden, wenn beide regulatorische Sequenzen vorhanden waren (s. Abb. 48). Diese Verstärkung gegenüber den einzelnen regulatorischen Sequenzen überstieg die simple Addition des Effektes der beiden Bereiche, womit eine synergistische Interaktion zwischen 5'-Promotor und 3'-Enhancer angenommen werden muss. Das Problem der Schleifenbildung spielte für den 3'-Enhancer scheinbar keine große Rolle mehr, wenn der 5'-Promotor vorhanden war, da vermutlich über den 5'-Promotor eine große Schleife zur Interaktion mit dem 3'-Enhancer ausgebildet werden konnte und eine sterische Hinderung kaum mehr existierte. Einziger Hinweis blieb, dass die reverse

Orientierung in 3'-Position des Enhancers eine geringfügig bessere Rettungseffizienz aufwies als die Vorwärtsorientierung.

Die regulatorische Information des 3'-Enhancers war auch in der Lage die Information des gesamten CaMV-35S-Promotors in den Blättern und Trichomen zu verstärken und in den anderen Organen (Wurzel, Hypokotyl und Kotyledonen) abzuschalten, wie die Änderung des GUS-Expressionsmusters bei der Fusion des 3'-Enhancers hinter das GUS-Gen demonstrierte. Somit fanden sowohl positive als auch negative Interaktionen zwischen dem *GLI*-3'-Enhancer und dem 35S-Promotor statt. Viele Hybride von pflanzlichen Promotoren mit dem 35S-Promotor oder mit Fragmenten des 35S-Promotors wurden bereits analysiert, wobei sich oft ein gegenseitiger Einfluss der regulatorischen Information zeigte (Chen *et al.*, 1988; Comai *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1989; Hohn und Fütterer, 1992; Huttly *et al.*, 1992; No *et al.*, 2000). Beispielsweise konnte ABA- und GA-Induktionsfähigkeit bestimmter, regulatorischer Bereiche auf den 35S-Promotor übertragen werden (Skriver *et al.*, 1991). Eine umfassende Änderung der Expression konnte für eine regulatorische Region des *rbcS-8B*-Gens (kodiert für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase) aus *Nicotiana plumbaginifolia*, die vor den 35S-Promotor (-105 bis +8) fusioniert wurde, nachgewiesen werden, wodurch eine starke Expression im Blatt und keine Expression mehr in der Wurzel festzustellen war (Poulsen und Chua, 1988). Diese Neudirektion der Expression durch das Hybrid aus *GLI*-3'-Enhancer und 35S-Promotor trat hier aber nicht in allen transgenen Linien auf, da die Interaktion mit der 3'-Region vielleicht nicht immer ausgebildet wurde. Erstaunlicher Weise zeigte das Expressionsmuster des Kontrollkonstruktes 35S::GUS-pAMPAT-GW in allen transgenen Linien ein fleckiges Muster in fast allen Pflanzenorganen und gerade die jungen, basalen Blattregionen, Blattprimordien und Trichome wiesen oft keine GUS-Färbung auf. Für 35S::GUS-Konstrukte mit einem anderen Grundgerüst-Vektor wurde jedoch zumeist eine kontinuierliche Färbung beschrieben (Benfey *et al.*, 1990b; Chisholm *et al.*, 2001; Odell *et al.*, 1985). Eine Erklärung für dieses fleckenartige GUS-Muster steht zurzeit noch aus. Der 35S-Promotor in pAMPAT-GW scheint aber funktional zu sein, da die in dieser Arbeit verwendeten, ebenfalls auf pAMPAT-GW basierenden Konstrukte 35S::TRY und 35S::CPC in den entsprechenden transgenen Pflanzen die typisch nackten Rosettenblätter vermittelten.

35S::GL1 führte in der *gli* Mutante nur in wenigen T1-Linien zu einer guten Rettung. Wenn die Transformanten entsprechend den Färbungen der 35S::GUS-Pflanzen teilweise keine Expression in Blattprimordien, sowie den basalen Blattteilen und den Trichomen aufwiesen, können diese auch keinen Beitrag zur Musterbildung aufweisen. Das regulatorische Hybrid aus 35S-Promotor und 3'-Enhancer zeigte eine sehr gute Rettung in vielen Linien, was die regulatorische Dominanz des 3'-Enhancers über den 35S-Promotor und eine Interaktion des Enhancers mit dem 35S-Promotor sehr wahrscheinlich macht. Dies war allerdings bei den Rettungsuntersuchungen nur in der reversen

Orientierung des Enhancers zu erkennen. In der Vorwärtsorientierung des Enhancers wurde die Rettung gegenüber 35S::GL1 erheblich reduziert. Eine Erklärung ist eine störende Interaktion des distalen Teils des Enhancers, der nur durch eine sehr kurze Schleife von 866 Nukleotiden (im Gegensatz zu 1905 Nukleotiden vom entsprechenden GUS-Konstrukt) mit dem 35S-Promotor interagieren kann, so dass der proximale Teil wahrscheinlich sterisch gehindert wird. Positionierung des 3'-Enhancers in einem größeren Abstand in beiden Orientierungen, würde darüber Aufschluss geben. Generell entspricht die gute Rettungseffizienz von 35S-Promotor mit *GLI*-3'-Enhancer den Analysen von Oppenheimer, der die Rettung von 35S::GL1 bereits untersuchte, wobei lediglich der 5'-Bereich des Komplementierungsfragments gegen den 35S-Promotor ausgetauscht wurde. Dadurch waren die gesamte 3'-regulatorische Sequenz inklusive des 3'-Enhancers inbegriffen, und die Schleifenbildung wurde im Gegensatz zum hier benutzten Konstrukt aufgrund der langen, genomischen Sequenz zwischen Start-Kodon und Beginn des 3'-Enhancers erleichtert (Oppenheimer *et al.*, 1991). Welche interagierenden Faktoren von *GLI*-3'-Enhancer und 35S-Promotor diesen regulatorischen Synergismus bedingen, ist zurzeit noch unklar.

Vergleicht man die transkriptionelle Regulation durch den 3'-Enhancer, den 5'-Promotor und den 35S-Promotor des *GLI*-Gens, so stellt man fest, dass der 3'-Enhancer eine wesentlich stärkere Expression als der 5'-Promotor steuert, was sowohl für die GUS-Färbung als auch für die Rettung der Musterbildung zutrifft. Die Funktion des 5'-Promotors besteht also demnach eher darin, den 3'-Enhancer zu verstärken. Allerdings trägt der 5'-Promotor auch gewebe- und zellspezifische Informationen und seine Funktion liegt nicht nur in einer quantitativen Verstärkung. Der 5'-Promotor inklusive des proximalen, untranslatierten 5'-Bereiches konnte zwar einige Trichome generieren aber kein gleichmäßiges Muster auf dem Rosettenblatt bilden, womit seine Eigenständigkeit für die *GLI*-Regulation eingeschränkt ist. Damit sollte der 3'-Enhancer eher als „3'-Promotor“ benannt werden und dem historisch definierten 5'-Promotor außerhalb des Kernpromotors qualitative und quantitative Enhancer-Eigenschaften zugeschrieben werden.

Unterschiede zwischen dem isolierten 3'-Enhancer und der Kombination von 3'-Enhancer mit dem 5'-Promotor oder dem 35S-Promotors konnten auf GUS-Ebene kaum detektiert werden. Der einzige Unterschied war die Expressionsstärke in adulten Blättern, die mit dem 5'-Promotor und dem 3'-Enhancer in 3'-Position sehr stark, mit dem 3'-Enhancer allein (unabhängig von der Position) noch stark, sowie mit dem 3'-Enhancer in 5'-Position und dem 5'-Promotor schwächer war. Ein ähnliches Verhalten konnte auch für die einzelnen Fragmente des 3'-Enhancers in Kombination mit dem 5'-Promotor beschrieben werden. Da diese Variationen der Positionierung *in planta* nicht existieren, können sie vernachlässigt werden.

Insgesamt zeigte sich, dass die GUS-Expression ohne die Rettungsanalysen wenig Aufschluss gab. Gleiche GUS-Färbung der Pflanzen entsprach nicht der gleichen Expression. Feine, aber sehr

entscheidende Modulationen der Expression, die durch die Interaktion von 3'-Enhancer mit 5'-Promotor und von 3'-Enhancer mit 35S-Promotor zustande kamen, hatten sehr große Auswirkungen auf die Musterbildung. Des Weiteren konnte auch die Wichtigkeit der sterischen Voraussetzung, d.h. eine große Distanz zwischen 5'-Promotor und 3'-Enhancer, für das regulatorische System von *GL1* erkannt werden, was im genomischen Zustand gegeben ist.

3.2.4 Andere regulatorische Bereiche des *GL1*-Gens

Bisher konnte gezeigt werden, dass der 5'-Promotor und der 3'-Enhancer des regulatorischen Gesamtsystems von *GL1* gemeinsam wichtige und unbedingt notwendige Bereiche sind, um eine korrekte Regulation der *GL1*-Expression zu ermöglichen. Grundsätzlich ist eine vollständige Rettung des *gll*-Hintergrundes mit 5'-Promotor und 3'-Enhancer des *GL1*-Gens aber nicht möglich, da in keinem Fall die wildtypische Anzahl der Trichome für die meisten T1-Pflanzen erreicht wurde. Im Gegensatz dazu ermöglichten die Promotoren von *GL2* und *AtML1* und die Kombination des CaMV-35S-Promotor mit dem 3'-Enhancer von *GL1* sehr gute Rettungen. Es müssen daher innerhalb des *GL1*-Gens noch weitere Module vorhanden sein, die an der Regulation beteiligt sind, da im Wildtyp kontinuierlich eine hohe Anzahl von Trichomen ausgebildet wird.

Zum einen wurde ein Fragment zwischen dem 5'-Promotor und der kodierenden Region, das die TATA-Box und den größten Teil der 5'-UTR beinhaltet, mit verstärkender Funktion für den 5'-Promotor (Pr9) identifiziert. Die Fusion dieses proximalen Bereichs mit dem 5'-Promotor ermöglichte im Gegensatz zu dem 5'-Promotor allein partielle Rettung. Wahrscheinlich würde diese Fusion in Kombination mit dem 3'-Enhancer im Kontrast zu der hier benutzten 5'-Promotor-3'-Enhancer-Kombination auch verbesserte Rettungseffizienzen liefern, was bisher aber nicht untersucht wurde. Dieses Fragment soll deshalb vorerst als proximaler Enhancer benannt werden, wobei ein ausschließlich quantitativer Effekt angenommen wird. Interaktionen zwischen quantitativen und gewebespezifischen Domänen sind zahlreich beschrieben worden (Gowik *et al.*, 2004; Hamilton *et al.*, 1998; Sandhu *et al.*, 1998). Um diesen Bereich als rein quantitativen Enhancer zu charakterisieren, muss er allerdings erst auf das Fehlen von gewebespezifischer, regulatorischer Information überprüft werden (Hamilton *et al.*, 1998; Sandhu *et al.*, 1998). Ob dieser proximale Enhancer alle Eigenschaften eines transkriptionellen Enhancers nach Banerji *et al.*, (1981) erfüllt, wurde in dieser Arbeit noch nicht analysiert.

Des Weiteren könnte das erste Intron des *GL1*-Gens eine Rolle spielen, das bereits als entscheidend für die *GL1*-Expression charakterisiert wurde (Wang *et al.*, 2004). Damit könnte es zum einen als transkriptionelles Modul fungieren, wie z.B. für das zweite Intron von *AGAMOUS* gezeigt wurde (Deyholos und Sieburth, 2000). In eigenen Untersuchungen wurde getestet, ob das erste Intron, wenn als Promotorfragment genutzt wird, als eigenständige, regulatorische Domäne dienen könnte

(Abb. 111). Dabei konnte keine GUS-Expression initiiert werden, so dass dies ausgeschlossen werden konnte. Dieses Intron könnte jedoch verstärkende oder reduzierende Einflüsse auf die bereits identifizierten Bereiche ausüben, d.h. die Kombinatorik mit den hier bestimmten Modulen müsste getestet werden. Alternativ könnte das Intron an der Intron-vermittelten Verstärkung (Intron-Mediated-Enhancement) beteiligt sein. Dabei verstärken die Introns die RNA-Akkumulation ohne die Rate der Transkriptionsinitiation zu erhöhen. Die Sequenz des Introns muss dann im Gegensatz zu transkriptionellen Enhancern innerhalb der transkribierten Region in der normalen Orientierung liegen (Rose und Beliakoff, 2000). Um dies zu testen, bieten sich Rettungsanalysen und GUS-Fusionen mit der gesamten kodierenden Region des *GLI*-Gens an, die bereits initiiert wurden. Auf diese Weise können gleichzeitig weitere Elemente innerhalb des zweiten Introns und der 3'-UTR identifiziert werden, sowie mögliche translationale Regulationswege erkannt werden.

3.2.5 Kombinatorische Eigenschaften der regulatorischen Module von *GLI*

Der 5'-Promotor und der 3'-Enhancer von *GLI* ließen sich in jeweils drei Domänen unterteilen (s. Abb. 117).

Zwei der Domänen des 5'-Promotors von *GLI*, Pr1 und Pr5, konnten eigenständige GUS-Expression in den Blättern und Trichomen vermitteln. Sie unterschieden sich aber deutlich in der Qualität (Abb. 34 und 45). So konnte zwar für beide Bereiche ubiquitäre Blattexpression nachgewiesen werden, aber die GUS-Expression für Pr1 war in Trichomen der Entwicklungsphasen 1 bis 6 und für Pr5 nur in den Phasen 3-6 nachzuweisen, d.h. zu unterschiedlichen Phasen der Trichomentwicklung wird die *GLI*-Expression folglich durch unterschiedliche Bereiche moduliert. Für Pr1 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine weitere Zergliederung zum vollständigen Verlust der Blattexpression führte, so dass eine cis-regulatorische Kombinatorik über den gesamten Bereich von Pr1 vorausgesetzt werden muss. Im Gegensatz dazu führte eine distale Deletion von Pr5 zu einer Reduktion der generellen Expressionsintensität, womit in dem deletierten Bereich verstärkende Information anzunehmen ist. Die Kombination der beiden Domänen Pr1 und Pr5 führte zu einer verstärkten Expression, die über die bloße Addition hinausging.

Erst die Kombinatorik einzelner Domänen des 5'-Promotors ermöglichte zu erkennen (vgl. Abb. 38), dass die mittlere Domäne und der proximale Enhancer antagonistischen, quantitativen Einfluss besitzen. Die mittlere Domäne Pr3 besaß inhibierende und der proximale Enhancer aktivierende Funktion. Der proximale Enhancer wurde bisher allerdings nicht allein, sondern immer nur in direktem Kontakt mit der auch *in Vivo* benachbarten Domäne getestet, so dass es durchaus möglich ist, dass er mit dieser interagiert.

Da die Hauptinformation für die Musterbildung im 3'-Enhancer lokalisiert war, könnten die 5'-Promotordomänen *in Vivo* modulativen Charakter in Abhängigkeit von diversen endogenen, zell- und gewebespezifischen sowie exogenen Reizen besitzen. Rettungsanalysen des *gll* Hintergrundes bestätigten die unterschiedlichen Funktionen der Domänen (s. Abb. 34). Die beiden 5'-Promotordomänen Pr1 und Pr5, die allein GUS-Expression vermittelten, waren in der Lage eine verbesserte Rettung durch den 3'-Enhancer zu bedingen (aber ohne den 3'-Enhancer zeigte das Fragment Pr1 wie der 5'-Promotor Pr9 keine Rettung). Erstaunlicher Weise konnte das stärkere, distale Fragment Pr1 in Kombination mit dem 3'-Enhancer dabei die Rettungseffizienz von dem 5'-Promotor Pr9 mit dem 3'-Enhancer aufbringen. Damit kann der distalen Domäne die entscheidende Rolle für den 5'-Promotor zugesprochen werden, und Pr5 beinhaltet möglicher Weise zusätzliche Information in Abhängigkeit von bestimmten Signalen. Die inhibierende Domäne Pr3 führte zu einer Reduktion der Rettung durch den 3'-Enhancer.

Zwei der drei identifizierten Domänen des 3'-Enhancers, Fragment-28 und Fragment-30, waren fähig starke Expression im Blatt und in den Trichomen zu vermitteln. Die dritte Domäne unterschied sich qualitativ von den anderen, da sie nur zu GUS-Expression in Trichomen in der Phase 1 bis 5 (6?) führte, aber keine basale Blattexpression aufwies (s. Abb. 45). Die Kombination von Fragment-28 oder Fragment-32 mit jeweils dem Fragment-30, vermittelte die GUS-Expression, die der von Fragment-30 alleine entsprach. Auch die Kombination des 5'-Promotors mit Fragment-30 führte zu der gleichen GUS-Expression. Daraus könnte man vorerst schließen, dass nur die mittlere Domäne entscheidende, regulatorische Information trägt.

Obwohl die GUS-Expression von Fragment-28 und Fragment-30 ununterscheidbar war, konnte gezeigt werden, dass ihr überlappender Bereich nicht allein verantwortlich für die regulatorische Information ist, da die Fragmente-28 und -30 nicht die gleiche Qualität der Rettung lieferten (s. Abb. 48). Die Information, die diese Überlappung beinhaltet, war aber essentiell, da die Deletion dieses Bereiches (Pr64, Pr65) in beiden Fragmenten zum Verlust der Expression führte (s. Abb. 51). Der überlappende Bereich allein ermöglichte allerdings keine GUS-Expression (s. Abb. 111). In jeder Domäne müssen folglich interne Interaktionen mit diesem Bereich angenommen werden.

Mit Hilfe von Rettungsanalysen wurde weiterhin geklärt, dass auch die schwache, hintere Domäne Fragment-32 des 3'-Enhancers eine Rolle spielt, da nur die Kombinatorik aller Domänen mit dem 5'-Promotor eine optimale Rettung ermöglichte, die die Kombination von nur drei Fragmenten nicht lieferte (s. Abb. 48).

Entscheidend sind damit die vielfachen, synergistischen Interaktionen zwischen den Domänen des 5'-Promotors, des proximalen Enhancers und des 3'-Enhancers (Abb. 117). Dies konnte durch die Rettungsanalysen der verschiedenen Fragment-Kombinationen demonstriert werden, durch die jeweils eine sehr viel bessere Rettung als durch einzelne Fragmente vermittelt wurde. Allerdings ist

zu beachten, dass die meisten Domänen spezifische Information für die Lokalisierung der Expression tragen. Dieser domänenartige Aufbau spiegelt also nicht nur eine Akkumulation von quantitativen Informationen zu dem grundsätzlichsten 3'-Enhancer-Subfragment-30 wider, sondern verschiedene Informationsverarbeitungseinheiten werden zur Gesamtinformation integriert.

Solche Interaktionen wurden in *Arabidopsis* bereits für die Subdomänen des 35S-Promotors beschrieben und werden durch Interaktion der bindenden Faktoren erklärt (Benfey *et al.*, 1990b, a).

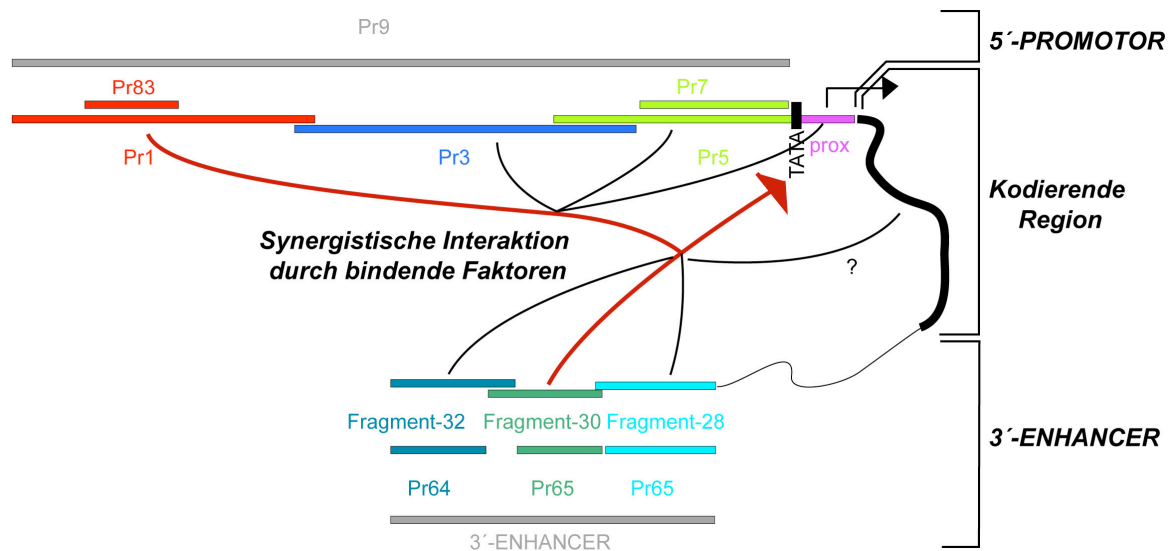


Abbildung 117: Übersicht über die Interaktion der cis-regulatorischen Bereiche von *GL1*

Zusammenfassende Darstellung der regulatorischen Bereiche von *GL1* in der genomischen Anordnung: Fragmente des 5'-Promotors Pr9, proximaler Enhancer (prox) und der Fragmente des 3'-Enhancers, sowie möglicherweise der kodierenden Region (?). Das gesamte Gen von *GL1* bildet eine sterische Schleife aus, um die Interaktion der verschiedenen, regulatorischen Bereiche und die Interaktion zur TATA-Box über die bindenden Faktoren zu ermöglichen und damit die Transkription (abgeknickter Pfeil) zu regulieren. Die grundsätzliche Information wird vermutlich durch das 3'-Enhancer-Fragment-30 vermittelt und das 5'-Promotorfragment Pr1 stark beeinflusst (rote Linien), während die anderen Bereiche die Information modulieren (schwarze Linien).

3.2.6 Regulatorische Bereiche und Kombinatorik des *WER*-Gens

Ein synergistisches Interaktionsnetz ließ sich auch für die regulatorischen Bereiche des *WER*-Gens erkennen (s. Abb. 67). Hier wurde zwar keine so komplexe Kombinatorik durchgetestet, aber die ersten Analysen sprachen auch hier für mehrere Bereiche, die unterschiedliche Expressionsdomänen in der Wurzelepidermis definieren, und synergistisch interagieren können. Allerdings war die Hauptinformation hier nicht im 3'-Bereich, wie bei *GL1*, sondern in dem proximalen 5'-Promotor (Pr20) lokalisiert, da dieser Bereich sein GUS-Expressionsmuster bei kombinatorischen Ansätzen gegenüber den anderen durchsetzte. Unterschiede zwischen den einzelnen regulatorischen Bereichen konnten zum einen in der Länge der Expressionsdomänen festgestellt werden. Die Expression begann zwar immer in der meristematischen Zone, wie bereits von Lee *et al.* (1999) beschrieben, konnte aber teilweise nur bis zum Beginn der Elongationszone (Pr19 oder 3'-Bereich) und bei Pr20 bis weit in diese Zone detektiert werden. Und zum anderen fiel

es schwer das bereits beschriebene Streifenmuster (Lee *et al.*, 1999) in der Wurzelepidermis zu detektieren, was aber in der eigenen Analyse auch für das bereits beschriebenen Konstrukt WER::GUS von Lee *et al.* (1999) zutraf. Diese Diskrepanz könnte zum einen auf intensive GUS-Färbung zurückzuführen sein, die Diffusion des GUS-Farbstoffs in die benachbarten Zellreihen ermöglicht. Dies kann durch Veränderungen der GUS-Färb-Prozedur oder durch den Einsatz von GFP mit ER-Lokalisierungssequenz als Reporter-Gen, das streng zellautonom ist (Crawford und Zambryski, 2000), gelöst werden. Andererseits konnte für den *GL2* und den *CPC*-Promotor ein sehr deutliches Zellreihenmuster in der Wurzelepidermis bei gleichzeitiger, intensiver Färbung mit der hier angewendeten GUS-Färbeprozedur detektiert werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Zellreihenspezifität von WER nicht ausschließlich sondern eher präferentiell ist. Gerade auch der Vergleich mit dem entsprechenden Aktivator für die Trichom-Musterbildung, *GL1*, legt ein derartiges Expressionsmuster nahe (*GL1* wird auch ubiquitär im Blatt und nicht nur in den Trichomen exprimiert). Das mittlere Promotorfragment Pr19 ebenso wie die 5'-deletierten Fragmente des proximalen Fragments Pr20 (Pr104, Pr105) zeigten hingegen das bereits beschriebene Streifenmuster des *WER*-Gens in der Wurzelepidermis, was aufgrund der Färbeproblematik eher auf einer Reduktion der Expressionsstärke als auf einer zunehmenden Spezifizierung basieren könnte.

Ob die hier untersuchten Bereiche des *WER*-Gens die gesamte Information für die transkriptionelle Regulation enthalten und durch welche Domänen die Musterbildung ermöglicht wird, muss durch Rettungsanalysen der *wer* Funktionsverlust Mutante noch bestimmt werden.

3.2.7 *Mutmaßliche, transagierende Faktoren der regulatorischen Sequenzen von GL1*

Regulatorische Domänen eines Promotors wurden oft für unterschiedliche Gewebe beschrieben (Benfey *et al.*, 1990b, a; Chandrasekharan *et al.*, 2003). Aber es gibt auch Nachweise für verschiedene Module in Promotoren in Abhängigkeit von verschiedenen, endogenen oder exogenen Faktoren, wie z.B. dehydratisierungsresponsive und etiolierungsinduzierte Bereiche, die unterschiedliche Expression in einem Gewebe bestimmen (Simpson *et al.*, 2003).

Bei *GL1* wie bei *WER*, wurde zwar mit den unterschiedlichen, regulatorischen Domänen jeweils die Expression in denselben Geweben gesteuert, d.h. Blattepidermis bzw. Wurzelepidermis, aber die genaue Lokalisation, Konzentration und eventuell der Zeitpunkt der Expression unterschieden sich zum Teil erheblich voneinander. Damit stellt sich hier die Frage, ob die einzelnen, identifizierten, regulatorischen Domänen in einem entwicklungsbiologischen oder umweltabhängigen Zusammenhang stehen, was sie als cis-regulatorische Module charakterisiert. Eine Antwort darauf kann die Untersuchung der cis-regulatorischen Elemente und der bindenden Faktoren liefern (Abb. 41 und Abb. 52).

Die Vorhersage von mutmaßlichen, wichtigen, cis-regulatorischen Elementen wurde auf der Grundlage von bereits identifizierten Elementen von Pflanzen unternommen und ihrem beschriebenen, funktionalen Kontext zugeordnet. Dazu wurde die Datenbank PLACE (Plant Cis-Acting Regulatory DNA Elements) benutzt. Bei diesem Ansatz ist davon auszugehen, dass nicht alle existierenden cis-Elemente identifiziert worden sind, da es sich um eine ständig weiterentwickelte Datenbank handelt (Rombauts et al., 2003). Auch können Variationen der Elemente zwischen unterschiedlichen Promotoren möglich sein, die nicht vollständig beschrieben wurden, wie bereits das vielfache Vorkommen von mehrdeutigen Nukleotiden innerhalb der beschriebenen Elemente deutlich macht. Viele Elemente und Kombinationen sind aufgrund bestimmter funktionaler Zusammenhänge entdeckt worden. Diese Zusammenhänge könnten hier einen Hinweis liefern, müssen aber nicht notwendiger Weise zutreffen. Die Identifikation der Elemente in den Fragmenten bedeutet nicht, dass sie alle eine Funktion für diese regulatorischen Bereiche besitzen müssen. Aus diesem Grund schließt sich in Zukunft die funktionale Untersuchung der Elemente durch Mutagenese, durch Bindungsstudien potentieller, bindender Faktoren, sowie durch Suche nach neuen Faktoren durch das Hefe-Ein-Hybrid-System an. Außerdem ist die Untersuchung der Promotordomänen unter speziellen umwelt- sowie entwicklungsbiologischen Kontexten, die sich durch die potentiellen, cis-regulatorischen Elemente vermuten lassen, notwendig. Auf diese Weise können die wirklich aktiven Elemente im Zusammenhang identifiziert werden.

Der proximale Enhancer (-123 bis -17) der 5'-Region des *GLI*-Gens zeichnete sich zunächst durch die beobachtete Transkriptionsverstärkung für den 5'-Promotor aus. Dies kann zum einen auf die endogene TATA-Box zurückgeführt werden. Wie eine Kernpromotorstudie in *Arabidopsis* gezeigt hat, häuft sich das Vorkommen des TATA-Motivs um das Nukleotid -32 bezogen auf den Transkriptionsstart (Molina und Grotewold, 2005). Die hypothetische TATA-Box von *GLI* befindet sich 33 Nukleotide vor dem hier identifizierten Transkriptionsstart bei -85 (bezogen auf den endogenen Translationsstart), ist damit in optimalem Abstand lokalisiert und könnte eine bessere Transkriptionsinitiation ermöglichen. Ob dies aber mit vorgeschaltetem 35S-Minimalpromotor im Vektor eine Rolle spielt, ist unklar. Eine kombinatorische Wirkung von cis-Elementen des proximalen Enhancers mit denen anderen Promotorfragmenten kann auch Ursache der Verstärkung darstellen. Dafür spricht das wiederholte Auftreten von Elementen.

Für den 5'-Promotor sind viele, funktionale Verbindungen der *in Silico* analysierten Elemente zu Phytohormonen und anderen exogenen Faktoren wie Licht, Niedrigtemperatur, Abwehr, Trockenstress und Hypoosmolarität auffällig. Sie erlauben der Trichom-Musterbildung vermutlich eine große Flexibilität in der Trichomdichte.

Die Gibberellinsäure (GA)-Abhängigkeit stellt einen guten Ansatz für die Regulation von *GLI* dar, da die Abhängigkeit der Trichominitiation und der *GLI*-Expression von GA bereits nachgewiesen wurde (Chien und Sussex, 1996; Perazza *et al.*, 1998). Die GA-Abhängigkeit wurde in dieser Arbeit durch Zugabe des GA-Biosynthese-Inhibitors Paclobutrazol ins MS-Medium getestet (s. Abb. 56). Da der Inhibitor nicht immer gleichmäßig verteilt werden konnte, wäre die Überprüfung in einer GA-Mangelmutante (z.B. *gal-3*) zur Absicherung der Daten empfehlenswert. Die eigenen Experimente konnten zeigen (vgl. Abb. 56), dass die GUS-Expression des 5'-Promotors oder des distalen Fragments Pr1 von GA abhängig war. Insbesondere war die Aufhebung der ubiquitären Blattexpression offensichtlich, während die Expression in den wenigen, trotz Inhibitor entwickelten Trichomen teilweise noch sichtbar war. Damit kommt GA eine bedeutende Rolle für die Blattexpression zu. Der 3'-Enhancer alleine zeigte keine Abhängigkeit von GA, diese konnte aber durch die Kombination mit dem 5'-Promotor übertragen werden, da mit Paclobutrazol nur noch Expression in den Trichomen intensiv zu detektieren war. Dies legt den Schluss nahe, dass die ubiquitäre Blattexpression durch 5'-Promotor in Kombination mit dem 3'-Enhancer über den 5'-Promotor blockiert wird und erst durch GA freigegeben wird. Eine solche Reprimierung wäre durch GA-Antagonisten, wie Abscisinsäure, denkbar (s. unten). Daran könnten auch die DELLA-Transkriptionsfaktoren (RGA, GAI, RGL1, RGL2, RGL3 in *Arabidopsis thaliana*, Sanchez-Fernandez *et al.*, 1998) beteiligt sein, die GA-Signaltransduktion reprimieren (Sun und Gubler, 2004). DNA-Bindungsstellen sowie die Zielgene für diese GRAS-Transkriptionsfaktoren sind zurzeit nicht bekannt (Sun, 2000). Möglich ist aber, dass sie selber transkriptionelle Aktivatoren oder Koaktivatoren darstellen, die die Expression negativer Komponenten der GA-Signaltransduktion kontrollieren (Ogawa *et al.*, 2000; Swain *et al.*, 2002). Als weiterer möglicher Repressor könnte ein homologes Zink-Finger-Protein zu dem HRT (HORDEUM REPRESSOR OF TRANSCRIPTION) aus Gerste in Frage kommen, das für die GA-induzierten Amylase-Gene der Aleuronschicht als reprimierend charakterisiert wurde und an GAREs bindet (Raventos *et al.*, 1998).

Die Fragmente Pr5 und Pr1 des 5'-Promotors sowie das distale Fragment-32 des 3'-Enhancers beinhalten regulatorische Elemente für GA-Abhängigkeit, die sogenannten GAREs (GA responsive element). Das Fragment Pr5 trägt die Elemente GAREAT und GARE2OSREP1. Pr1 und Fragment-32 besitzen ebenfalls das Element GAREAT, das Übereinstimmung mit den Elementen AMYBOX1 und MYBGAHV aufweist. Das Element GAREAT ist in GA induzierbaren Genen von *Arabidopsis thaliana*, und die AMYBOX1 ist in Hydrolase-Genen von Monokotylen (Reis und Gerste) identifiziert worden. Das Element GAREOSREP1 konnte aus Reis und das Element MYBGAHV aus Gerste bestimmt werden (Gubler *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 2003; Sutoh und Yamauchi, 2003). GAREs allein können die GA-Abhängigkeit eines

Minimalpromotors bewirken (Skriver *et al.*, 1991). Der sogenannte GARC (GA responsive complex) kann weitere Elemente enthalten, wie z.B. eine Pyrimidin-Box, die alleine keine regulatorische Funktion übernehmen kann, oder ein CARE-Element (CAACTC responsive element) (Skriver *et al.*, 1991; Sun und Gubler, 2004; Sutoh und Yamauchi, 2003). Ein CARE-Element findet sich in Fragment-30 und eine Pyrimidin-Box in Fragment-32 (Cercos *et al.*, 1999; Sutoh und Yamauchi, 2003). Bindende Faktoren können u.a. MYB- und DOF-Transkriptionsfaktoren sein, wobei der MYB-Faktor (GaMYB) an das GARE-Element und DOF-Faktoren an die Pyrimidin-Box binden (Sun und Gubler, 2004). Außerdem kann für *GLI* das Element GADOWNAT identifiziert werden, das für die GA-vermittelte Runterregulation in *Arabidopsis* Samen identifiziert wurde (Ogawa *et al.*, 2003). Zwei GADOWNAT-Elemente umgeben die positiven GA-Elemente von Pr5 und eines befindet sich in dem überlappenden Bereich von Fragment-28 und -30. Die GA-Induktion ist zwar essentiell für die ubiquitäre Blattexpression von *GLI*, aber eine komplexe, interaktive und feinregulatorische GA-Abhängigkeit für *GLI* kann zusätzlich in diesen cis-Elementen ihre Grundlage finden.

Direkt neben der TATA-BOX befindet sich eine kurze Sequenz, die sich durch das MYC-Element CACGTGMOTIF (Bindung von GBF, G-box-binding factor) und die regulatorischen Elemente für bZIP-Transkriptionsfaktoren auszeichnet: DPBFCOREDCDC3 (Bindung von AtDPBFs, z.B. ABI5 (Kim *et al.*, 2002)) und ein ABRE (abscisin responsive element). Die hier identifizierten bZIP-Bindungsstellen stehen im Zusammenhang mit Abscisinsäure (ABA)-Regulation, Trockenstress, sowie Lichtregulation (Busk und Pages, 1998; Chandrasekharan *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 2002; Finkelstein und Lynch, 2000). ABREs beinhalten im Kern das Motiv ACGT und setzen sich zumeist aus 8-10 Nukleotiden zusammen. ABRE- oder ACGT-enthaltende Elemente werden eher durch ihren funktionalen Zusammenhang als durch ihre flankierenden Sequenzen definiert. Laut weiterer Studien können ABREs und ACGT-Sequenzen auch lichtinduzierte, dunkelinduzierte oder UV-Antworten vermitteln (Busk und Pages, 1998; Feldbrügge *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 2003). ABA-Induktionsfähigkeit wird durch mehrere ABREs vermittelt, aber einzelne Elemente sprechen nicht auf ABA an (Skriver *et al.*, 1991). Aus diesem Grund spricht das Vorkommen von mehreren ACGT- oder ABRE-Motiven in Pr5 bei -138, -225, -230, -435 und in Pr1 bei -1045 neben der bereits besprochenen im proximalen Enhancer bei -109 für einen bZIP-Transkriptionsfaktor vermittelten, kombinatorischen Regulationsmechanismus von *GLI*. Für die ABA-Regulation spielt oft der ABRC (ABA-responsive complex) eine Rolle, der aus einem ABRE und einem „Kupplungselement“ (Coupling Element) besteht, wobei letzteres in seiner Sequenz sehr variabel ist (Shen und Ho, 1995; Shen *et al.*, 1996). Es gibt auch einen ABA-unabhängigen Regulationsweg für Trockenstress über die DRE-Elemente (Drought responsive element), wobei aber auch Interaktionen zwischen ABREs und DRE-Elementen beschrieben wurden. (Narusaka *et al.*, 2003).

Ein bisher bekanntes Kupplungselement oder ein DRE-Element konnte jedoch für *GL1* nicht identifiziert werden. Des weiteren findet man in Pr1 und Pr5 Bindungsstellen für die MYB-Transkriptionsfaktoren MYB1AT und MYB2AT, die auch im Zusammenhang mit der Regulation durch Trockenstress und Abscisinsäure stehen (Abe *et al.*, 2003a; Abe *et al.*, 1997; Urao *et al.*, 1993). Im näheren Umfeld können auch MYC-Bindungsstelle lokalisiert werden, die in Interaktionen mit den MYB-Bindungsstellen über die jeweils bindenden Faktoren involviert sein könnten. Interaktionen zwischen MYB-, bHLH- und bZIP-Transkriptionsfaktoren wurden als regulatorische Einheit publiziert, allerdings im Zusammenhang mit der Lichtinduktion (Hartmann *et al.*, 2005). Ein Effekt von Trockenheit und Abscisinsäure auf die Trichomdichte kann angenommen werden, da zum einen die Reduktion der Trichomanzahl unter Trockenstress in *Arabidopsis thaliana* nach eigenen, unveröffentlichten Beobachtungen und zum anderen für andere Pflanzen beobachtet wurde (Quarrie und Jones, 1977). Für eine Regulation durch ABA, spricht auch die antagonistische Wirkung zu GA, die z.B. bei der Samenentwicklung (Cercos *et al.*, 1999; Skriver *et al.*, 1991; Sun und Gubler, 2004) und bei der Festlegung der embryonalen Organidentität vom Kotyledonen eine Rolle spielt (Gazzarrini *et al.*, 2004). Folglich könnte ABA auch für die GA-abhängige Regulation von *GL1* eine antagonistische Rolle übernehmen. Aus diesen Gründen steht zunächst die experimentelle Überprüfung der Wirkung von ABA auf die Trichominitiation für die Zukunft an.

Hormone wie Jasmonat und Salicylsäure spielen nachweislich eine Rolle bei der Trichominitiation: Jasmonat, das mit GA synergistisch interagiert erhöht die Trichomdichte, während sie durch Salicylsäure erniedrigt wird, da Salicylsäure die Antwort auf Jasmonsäure inhibiert (Traw und Bergelson, 2003). GT1-Elemente können mit Salicylsäure-Induktion in Kontakt gebracht werden. Sie befinden sich zahlreich im 5'-Promotor (Buchel *et al.*, 1999). Das Element T/GBOXATPIN2 kann in Pr5 lokalisiert werden. Es ist für Jasmonat-Induktion verantwortlich und stellt eine Bindungsstelle für die bHLH-Transkriptionsfaktoren JaMYC1 und JaMYC2 dar (Boter *et al.*, 2004). Des weiteren konnten zwei Auxin-abhängige Elemente ARFAT in Pr1 identifiziert werden, an die die ARF-Faktoren als Dimer binden (Ulmasov *et al.*, 1999). Die Beschreibung von antagonistischen Interaktionen zwischen ABA/ Jasmonat und Ethylen, um Abwehr und Resistenz zu modulieren, sowie die kombinatorische Wirkung von Jasmonat und Auxin bei der Stressantwort (Anderson *et al.*, 2004; Chen und Singh, 1999) macht eine kombinatorische Wirkung dieser Hormone bei der Regulation der Trichomdichte wahrscheinlich. Aber auch eine gegenseitige Beeinflussung von GA und Auxin könnte in Betracht kommen, die für das Wurzelwachstum bereits beschrieben wurde (Fu und Harberd, 2003). Außerdem kann die Stabilität der Repressoren RGA, GAI z.B. durch Auxin vermittelten Abbau beeinflusst werden (Fu und Harberd, 2003). Gerade die

eng benachbarte Lokalisation der ARF-Bindungsstellen und der GAREs könnte auf einen Zusammenhang hinweisen.

Trichome stellen wahrscheinlich einen Schutz des Blattes z.B. vor Insektenfraß dar (Mauricio und Rausher, 1997), und künstliche Verletzung führt in *Arabidopsis thaliana* zur Erhöhung der Trichomdichte (Traw und Bergelson, 2003). Ein Einfluss der Pathogenabwehr als Schutzmaßnahme durch Änderung der Trichomdichte ist damit gut denkbar.

Im Zusammenhang mit Pathogenabwehr stehen, neben Jasmonsäure und Salicylsäure, WRKY-Transkriptionsfaktoren (Eulgem *et al.*, 2000). Im 5'- und 3'-Bereich finden sich einzelne, zugehörige WRKY-Bindungsstellen (W-Boxen). Die Funktion einzelner WRKY-Bindungsstellen in Pr1, dem proximalen Enhancer und den Fragmenten des 3'-Enhancers ist unklar, da WRKY-Transkriptionsfaktoren oft in kurzen Promotorsegmenten gehäuft vorkommen und synergistisch interagieren (Eulgem *et al.*, 2000). Eine Ansammlung von W-Boxen lässt sich in dem mittleren 5'-Promotorfragment Pr3 identifizieren, die durchaus eine negative Regulation vermitteln könnten, wie für WRKY-Transkriptionsfaktoren gezeigt wurde (Robatzek und Somssich, 2001, 2002). Für die Pathogenabwehr sind auch die Elemente MYB1LEPR, SEBFCNSSTPR10A und SP8BFIBSP8BIB des Fragments Pr1 von Interesse (Boyle und Brisson, 2001; Chakravarthy *et al.*, 2003). Gerade das letzte Element steht im Zusammenhang mit WRKY-Transkriptionsfaktoren, die eine bindende Proteindomäne für dieses Element besitzen (Ishiguro und Nakamura, 1994).

Die identifizierten, regulatorischen Elemente von *GLI* könnten auch eine Lichtregulation ermöglichen. Ob Licht und Etiolement auch eine Rolle bei der Trichomininitiation ausüben, wurde noch nicht untersucht. In 5'-Promotor wurden mehrere GT1CONSENSUS-Elemente identifiziert, die auch im Zusammenhang mit der Lichtinduktion stehen (Zhou, 1999). Da eine kombinatorische Interaktion lichtresponsiver Elemente für andere Systeme nachgewiesen werden konnte (Chattopadhyay *et al.*, 1998), könnten sie hier einen Einfluss ausüben. Auch die Elemente IBOXCORE und TBOXATGAPB wurde im Zusammenhang mit Lichtregulation charakterisiert, und können mehrmals im 5'-Promotor nachgewiesen werden (Chan *et al.*, 2001; Terzaghi und Cashmore, 1995). Des Weiteren wurde sowohl in Pr1 als auch in Pr5 das Element REALPHALGLHCB21, das für Phytochrom-Regulation benötigt wird, lokalisiert (Degenhardt und Tobin, 1996).

Eine weitere Verbindung zu extrinsisch vermittelter Regulation stellt das sowohl in Pr1, Fragment-32 als auch in dem proximalen Enhancer vorhandene Element PREATPRODHDar, das in der hypoosmolaren Antwort involviert ist. In Pr1 finden sich außerdem zwei LTRE-Elemente (low-temperature responsive element) die in die Niedrigtemperaturantwort involviert sind (LTRE1HVBLT49). Eine Modulation der Trichomdichte kann in Abhängigkeit von der Temperatur

festgestellt werden, wofür die Mutante *hos9* spricht, deren Gen Kältetoleranz vermittelt und deren Mutante Reduktion der Trichomdichte aufweist (Zhu *et al.*, 2004).

GL1 kann wahrscheinlich durch ein komplexes Netzwerk zur Verarbeitung von übergeordneten Signalen reguliert werden. Ob die hier beschriebenen Elemente und Signale auch die gewebe- und zellspezifische Expression der Fragmente dirigieren können, denn *GL1* ist ein für die epidermis-spezifischer Faktor (Larkin *et al.*, 1993), ist unklar und muss experimentell überprüft werden. Organ- und Gewebespezifität der Trichombildung beruht auf entwicklungsbiologischen Kontexten.. Zeitlich wird die Trichominitiation durch *REDUCED TRICHOME NUMBER (RTN)* kontrolliert, was zu einem verfrühten Stillstand der Trichominitiation in *Ler*-Hintergrund führt (Larkin *et al.*, 1996). Dass das zugehörige Gen nicht charakterisiert ist, kann seine mögliche Rolle für die *GL1*-Regulation nicht eingeschätzt werden.

Das Gen *COTYLEDON TRICHOME1 (COT1)* übt einen negativen Einfluss auf die Produktion von Trichomen aus und wird mit der *GL1* abhängigen Regulation der Trichominitiation in Verbindung gebracht, da die Mutante *cot-1* bei gleichzeitiger *GL1*-Überexpression auf den Kotyledonen zu einer hohen Anzahl von ektopischen Trichomen führt (Szymanski *et al.*, 1998b). Die Mutanten *leafy cotyledon1 (lec1)*, *leafy cotyledon2 (lec2)* und *fusca3 (fus3)* produzieren ebenfalls ektopische Trichome auf Kotyledonen, wobei die Kotyledonen in trichomtragende Blätter transformiert werden (Curaba *et al.*, 2004; Gazzarrini *et al.*, 2004; Keith *et al.*, 1994;; Meinke *et al.*, 1994; West *et al.*, 1994). Außerdem führt die Überexpression von *LEC1* zum Verlust der Trichome auf den Blättern (Lotan *et al.*, 1998). Der Verlust der Embryonalität der Kotyledonen spielt hier sicherlich eher eine entscheidende Rolle für die Trichom-Musterbildung als die direkte Regulation von *GL1*, so dass ein indirekter Effekt durch den Wechsel der Organidentität zur Trichominitiation führt. Negative GA-Regulation z.B. durch *FUS3* (Curaba *et al.*, 2004; Gazzarrini *et al.*, 2004) könnte aber die *GL1*-Expression beeinflussen. Allerdings wurde gezeigt, dass *FUS3* auch *TTG1* negativ reguliert (Tsuchiya *et al.*, 2004).

Das Gen *CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS1 (COP1)*, ein negativer Regulator der Lichtregulation im Zusammenhang mit dem COP9-Signalosom (Schwechheimer und Deng, 2000), beeinflusst ebenso die Trichominitiation da in mutanten *cop1* Sektoren ektopische Trichome auf Karpellen gebildet werden (Miséra *et al.*, 1994). *COP1* wird als Inhibitor von *TTG1* angenommen (Hülkamp *et al.*, 1994, Miséra *et al.*, 1994,)

Es müssen folglich nicht alle Regulationswege der Trichominitiation über *GL1* erfolgen. Stattdessen können *TTG1*, *GL3* sowie *EGL3* als weitere Aktivatoren der Musterbildung natürlich auch beeinflusst werden, zumal *GL1* keine so große Rolle in der Organspezifizierung zugesprochen wird, da sein Überexpressionsphänotyp kaum ektopische Trichome aufweist (Larkin *et al.*, 1994).

Für *GL1* gibt es nur wenige Hinweise auf Elemente, die eine gewebe- oder zellspezifische Expression vermitteln könnten.

In Pr5 könnten MYB-Faktoren, die an die beiden MYB1AT (MYB-Bindungsstelle in dem Gen *RD22*) und die beiden MYB2CONSENSUS-Elemente binden, Interaktoren liefern (s. Abb. 41). Eine Interaktion mit Faktoren, die an die MYC-Bindungsstelle in Pr5 binden, könnte stattfinden, da die Interaktion zwischen MYB und bHLH-Transkriptionsfaktoren oft beschrieben wurde (Abe *et al.*, 2003a; Baudry *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2004). Für Pr5 wäre eine spezifische Regulation durch die MYB-Bindungsstellen MYBST1 möglich. Die MYBST1-Stelle wurde in *Solanum tuberosum* identifiziert und stellt eine Bindungsstelle für einen Ein-Repeat-MYB-Faktor mit Aktivierungsdomäne dar (Baranowskij *et al.*, 1994). Das Gen *AtMYBL2* aus *Arabidopsis thaliana* ist von diesem MYB-Typ und könnte über die MYBST1-Bindungsstelle *GL1* regulieren. Es wird hauptsächlich im Blatt exprimiert, und seine Überexpression kann die Trichomininitiation inhibieren (Kirik und Bäumlein, 1996; Sawa, 2002), so dass dieser Faktor die *GL1*-Expression eventuell in einem bestimmten Maße runterregulieren kann. Die Wiederholung von Elementen in PR7 und im distalen Bereich von Pr5 spricht für einen additiven Effekt von Faktoren, der eine Verstärkung der Expression in Pr5 gegenüber Pr7 verursachen könnte (And-Logik, Howard und Davidson, 2004). Die vielfach vorkommenden ACGT-Elementen, GT1-Elemente und IBOX-Elemente könnten ebenso eine solche Verstärkung verursachen. Zwei spezielle CARG-Boxen (C-A/T-rich-G) sind in dem spezifischen und dem verstärkenden Bereich von Pr5 vorhanden. Eine Regulation über MADS-Box-Transkriptionsfaktoren wäre möglich, die oft im Zusammenhang mit Organspezifität steht (Becker und Theissen, 2003). Für die hier identifizierten CARG-Boxen wurde die Bindung des MADS-Faktors AGL15 nachgewiesen (Tang und Perry, 2003). *AGL15* wird zwar nur im Embryo exprimiert, aber die Expression des verwandten Gens *AGL18* derselben Unterfamilie, konnte auch im Blatt nachgewiesen werden (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Außerdem zeigt ein weiterer MADS-Box-Faktor, AGL16, spezifische Expression in Trichomen, Wurzelepidermis und in den Schließzellen der Spaltöffnungen des Blattes und des Hypokotyls (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Da allen hier aufgeführten Zelltypen, außer den Blattstomata, ein vergleichbarer, epidermaler Musterbildungsmechanismus zugrunde liegt (Berger *et al.*, 1998c; Hung *et al.*, 1998; Lin und Schiefelbein, 2001; Pesch und Hülskamp, 2004), könnte eine generelle Regulation durch *AGL16* sehr gut in Betracht kommen.

Das distale 5'-Promotorfragment Pr1 konnte für die Trichomspezifität auf einen mittleren Bereich (Pr83) eingegrenzt werden, aber die ubiquitäre Blattexpression konnte bei weiterer Eingrenzung nicht detektiert werden. In Pr83 sind kaum spezifische Elemente zu identifizieren. Einerseits könnte das Element MYB1LEPR hier wieder zusammen mit einer MYC-Bindungsstelle und mit einem ACGT-Motiv eine Interaktion von MYB-, bHLH- und bZIP-Transkriptionsfaktoren verursachen.

Andererseits könnten zwei Auxin abhängigen Elemente (ARFAT) und das Element GAREAT eine direkte Regulation durch die Phytohormone GA und Auxin erlauben, zumal die Trichomexpression dieses kurzen Fragments Pr83 durch die Zugabe des GA-Inhibitors Paclobutrazol völlig eliminiert wird. Eine synergistische Interaktion zwischen dem trichomspezifischen und dem verstärkenden/blattspezifischen Bereich Pr1 muss angenommen werden, da sowohl die vorderen Pr1-Subfragmente (Pr81 und Pr82) als auch das hintere Pr1-Subfragment (Pr85) keine eigenständige Expression lieferten (vgl. Abschnitt 2.3.8). Es finden sich aber keine übereinstimmenden Elemente zwischen diesen Bereichen von Pr1, so dass neue Faktoren zu den an Pr83 bindenden hinzukommen müssen. Hier könnten u. a. die lichtregulierten GT1-Elemente, die beiden niedrigtemperatur-regulierten LTRE-Elemente und MYB-Bindungsstellen eine Rolle spielen. Eine weitere interessante Bindungsstelle stellt das Element CIANDIANLELHC in Pr83 dar. Es ermöglicht die circadiane Expression des *LHC*-Gens in Tomate (Piechulla *et al.*, 1998). Eine zeitliche modulierte Expression könnte auch für *GLI* eine Rolle spielen, um statistische Fluktuationen der Aktivator-Konzentrationen zu ermöglichen, die für den Musterbildungsmechanismus postuliert werden.

Die wenigen identifizierten, räumlich-spezifischen Elemente zeigen, dass entweder wichtige Elemente noch nicht charakterisiert wurden, oder, dass die Kombinatorik der bindenden Faktoren die Spezifität der Regulation durch die 5'-Promotorfragmente liefert. Die Vielfalt der möglichen, übergeordneten Signale und die geringe initiale Funktion des 5'-Promotors in der Musterbildung spricht für eine modulierende Aufgabe des 5'-Promotors. Er könnte folglich vielfältige Einflüsse durch Transkriptionsfaktor-Komplexe verarbeiten und zusammen mit denen des 3'-Enhancers an den BTA weiterleiten, da der 3'-Enhancer eine autarke Regulation für die Trichom-Musterbildung besitzt, die durch den 5'-Promotor verbessert werden kann.

Der 3'-Enhancer von *GLI* konnte in drei Fragmente unterteilt werden (s. Abb. 45, 48, 117). Das Fragment-30 des 3'-Enhancers scheint mit 184 Nukleotiden das wichtigste Minimalfragment für die Musterbildung zu sein, da es eine von anderen Bereichen unabhängige, gute Trichom-Musterbildung vermittelte und eine starke GUS-Expression lieferte. Im Gegensatz dazu konnte z.B. der 5'-Promotor mit dem proximalen 5'-Enhancer nur vereinzelt Trichome initiieren, wobei kein wirkliches Muster zu identifizieren war. Durch Deletionsstudien ist es möglich, neben den oben aufgeführten Interaktionen mit dem 5'-Promotor, Aussagen über dessen Regulation machen zu können. Deshalb soll Fragment-30 mit seinen möglichen bindenden Faktoren hier im Detail diskutiert werden und die Anordnung der cis-regulatorischen Elemente wurde in der Übersicht in Abb. 118 dargestellt.

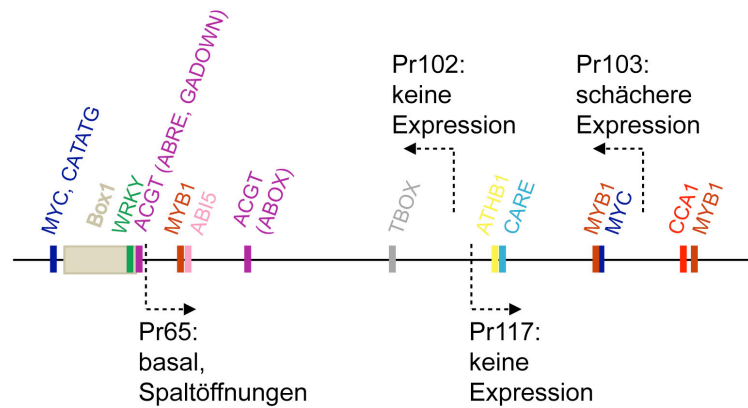


Abbildung 118: Anordnung der cis-regulatorischen Elemente des wichtigen, mittleren 3'-Enhancer-Fragments-30 des *GL1*-Gens

Schematische Darstellung der verschiedenen, cis-regulatorischen Elemente des Fragments-30 des 3'-Enhancers von *GL1*. Die Abkürzungen können folgenden Elementen zugeordnet werden: ACGT (ACGTERD1), ATHB1 (ATHB1ATCONSENSUS), CATATG (CATATGGMSAUR), CARE (CAREOSREP1), CCA1 (CCA1ATLHCB1), MYB1 (MYB1AT), MYC (MYCCONSUSAT), WRKY (WBOX), TBOX (TBOXATGAPB). Die Box1 beschreibt das Motiv, das in dem MEME-Vergleich mit den minimalen regulatorischen Bereichen von *TRY* und *CPC* identifiziert wurde.

Eine kurze 5'-Deletion des Fragments-30 in Pr65 führte zum Verlust der Trichom- und der starken ubiquitären Blattexpression, sowie stattdessen zu Expression in den Schließzellen des Spaltöffnungsapparats (s. Abb. 51). Die Umspezifizierung der Expression könnte durch den Wegfall einer Bindungsstelle für einen hypothetischen Repressor der Trichominitiation in den Schließzellen erklärt werden. Die MYB-Faktoren FLP (FOUR LIPS) und AtMYB88 könnten u.a. daran beteiligt sein, da sie für den korrekten Zeitpunkt der Transition vom Zellzyklus zur terminalen Differenzierung der Schließzellen wichtig sind (Lai *et al.*, 2005), und könnten damit direkt oder indirekt das Trichomschicksal in den Vorläufer-Schließzellen unterdrücken. Eine solche Regulation könnte die ansonsten aktivatorische Wirkung von Fragment-30 in den Spaltöffnungen unterbinden. Damit würde die Trichominitiation gerade an der Position der Schließzellen verhindert, da Trichome und Schließzellen um den gleichen Pool von Epidermiszellen konkurrieren, aber nicht in der gleichen Zelle initiiert werden dürfen. Die Spaltöffnungs-differenzierung beginnt zwar nach der eigentlichen Trichominitiation und -musterbildung, die basipetal fortschreitet, aber es können in der Epidermis des auswachsenden Blattes im Col Hintergrund immer noch neue Trichome gebildet werden, so dass die Protodermis, auch wenn sich Spaltöffnungen differenzieren, ihre Kompetenz für das Trichomschicksal behält (Larkin *et al.*, 2003).

In dem deletierten Bereich zu Pr65 befinden sich ein Element, das in der Auxin-Antwort (CATATGGMSAUR) involviert ist, eine MYC-Bindungsstelle, eine W-Box und ein ABRE (s. Abb. 52 und Abb. 118). Außerdem findet sich hier die Box1, die in einer Motivsuche (MEME) mit dem minimalen, regulatorischen Bereich des *TRY*- und *CPC*-Promotors identifiziert wurde, die

bisher unbekannte Bindungsstellen beinhalten könnte (s. Abb. 110). Diese Box trägt die Sequenz GTTGACACG, die außer dem unterstrichenen Cytosin-Nukleotid vollständig komplementär zu einem Element des *LEAFY*-Promotors (CAACTGTC) ist, das für den Expressionsanstieg im Kurztag und GA-Induktionsfähigkeit verantwortlich ist (Blazquez und Weigel, 2000). Ein bindender Faktor für diesen Bereich ist noch nicht identifiziert worden, ein MYB-Faktor wäre aber aufgrund der internen MYB-Bindungsstelle denkbar. Ob diese komplementäre Sequenz eine Funktion für die *GLI*-Regulation haben könnte, muss durch Motiv-Mutagenese und Expressionsstudien in Abhängigkeit von der Photoperiode getestet werden. Eine Regulation über den Kurztag wäre, neben der bereits beschriebenen GA-Abhängigkeit (s.o.) durchaus denkbar. Im Kurztag werden bis zur generativen Phase wesentlich mehr Blätter als im Langtag angelegt. Die Produktion von Trichomen auf den abaxialen Blättern findet erst auf späteren Blättern statt. Damit verbunden nimmt die adaxiale Trichomdichte ab. Für den Langtag konnte gezeigt werden, dass abaxiale Trichome auf früheren Blättern entstehen, als im Kurztag (Chien und Sussex, 1996). Im Kurztag wäre somit eine längere Initiation auf der adaxialen Seite denkbar, die durch *GLI* reguliert wird. Eine koregulierte Expression mit dem Inhibitor *TRY* über dasselbe Element könnte folglich auch Sinn machen, um auch sein Expressionslevel im Kurztag aufrecht zu erhalten.

Eine weitere Deletion des 5'-Endes von Fragment-30 in Pr117 führte zum vollständigen Verlust der Expression. Die deletierte Sequenz beinhaltet eine MYB1AT-Element, eine ACGTABOX und eine TBOX. Da in der Sequenz Pr117 zwei MYB1AT-Bindungsstellen, eine CCA1-MYB-Bindungsstelle (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED*, kodiert für ein Phytochrom regulierten R1-Typ-MYB-Faktor; Wang *et al.*, 1997) und eine MYC-Bindungsstelle auftreten, könnte eine Interaktion von mehreren MYB-Faktoren des R2R3- und des R1-Types, mit bHLH und bZIP-Transkriptionsfaktoren, die über Fragment-30 verteilt sind, für die Regulation der Expression eine Rolle spielen. Dafür spricht auch, dass die erste Deletion vom 3'-Ende des Fragments-30, die die MYB1AT- und CCA1-Bindungsstelle in Pr103 entfernt, eine starke Reduktion der Expression verursachte. Die zweite 3'-Deletion eliminierte die andere MYB1AT und MYC-Bindungsstelle und ermöglichte keine Expression mehr.

Neben diesen Bindungsstellen und den zugehörigen, bindenden Transkriptionsfaktoren könnte auch die identifizierte HD-ZIP-Bindungsstelle eine entscheidende Rolle übernehmen. Sie wurde als Bindungsstelle für *ATHB1* beschrieben, das in die HD-ZIP Klasse I gruppiert wurde (Sessa *et al.*, 1994; Sessa *et al.*, 1993). Funktionale Informationen über die HD-ZIP der Klasse I sind beschränkt (Johannesson *et al.*, 2001). Ein Hinweis für die Rolle in der Pflanzenentwicklung ist, dass *ATHB1*-Überexpression in Tabak das Blattzellschicksal beeinflussen kann (Aoyama *et al.*, 1995). Aufgrund der entwicklungsbiologischen Rolle im Blatt könnte eine Funktion von *ATHB1* bei der Trichominitiation möglich sein.

Im proximalen Fragment-28 führte die Deletion des überlappenden Bereichs zu Fragment-30 ebenfalls zum Verlust der Expression. Dabei gehen auch hier die Box1, die W-Box und die ACGT-Box verloren. Daraus kann man schließen, dass diese Region, die alleine in dem Fragment Linker-67 keine Expression lieferte, mit den übrigen Elementen des Fragments-28 interagieren muss, um die ubiquitäre Blatt- und Trichomexpression zu vermitteln. Interessant sind die beiden proximalen Elemente, eine ACGT-Box und ein RAV1AAT-Element, deren Deletion den Verlust der GUS-Expression bedingte. Der Transkriptionsfaktor RAV1 bindet immer an zwei Elemente RAV1A und RAV1B, aber RAV1B kann hier nicht identifiziert werden, wodurch die funktionale Bedeutung fraglich bleibt (Kagaya *et al.*, 1999). Die ACGT-Box könnte wieder eine bZIP-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle sein. Hinweise zu möglichen interagierenden Faktoren sind bisher unklar. Eventuell könnte eine erneute CArG-Box des obigen Types, eine W-Box, ein GT1-Element und die ACGT-Box im mittleren Bereich von Fragment-28 eine Rolle spielen. Über die weiteren, hier gefundenen Elemente NAPINMOTIFBN des Napin-Gens von *Brassica napus* und CGACGOSAMY3 des AMY3-Gens aus Reis mit ungeklärter Funktion kann keine Aussage gemacht werden.

Das Fragment-32 des 3'-Enhancers konnte nur schwache Expression in Trichomen vermitteln. Der Verlust des 5'-Bereiches des Fragments führte zum Verlust der Expression. In diesem deletierten Bereich kann eine ähnliche Sequenz zu Box1 und Elemente, die eine bereits beschriebene Verbindung zur Signaltransduktion von GA und Hyposmolarität beitragen, lokalisiert werden. Aber auch der Verlust des 3'-Bereiches führte zum Verlust der Expression. Auffällig ist, dass hier genau wie in Fragment-28 eine RAV1A-Bindungsstelle sitzt. Vielleicht kann ein RAV1-Faktor auch alleine über ein RAV1A-Element oder zusammen mit einer etwas modifizierten, bisher nicht bekannten RAV1B-Bindungsstelle interagieren. In Fragment-32 finden sich im mittleren Bereich zwei GT1-Elemente, eine ACGT-Box und eine W-Box, was für kombinatorische Regulation sprechen kann.

Der Vergleich der Fragmente Pr1, Pr5, Fragment-28, Fragment-30 und Fragment-32 zeigt, dass viele der identifizierten Elemente in mehreren Fragmenten vorkommen (s. Tab. 9). Dies stärkt die Hypothese der Regulation durch synergistische Interaktion und des modulären Aufbaus für *GLI*, um die fein abgestimmte Expression zu ermöglichen. Auffällig sind die oft auftretenden MYB1AT-Elemente und MYC-Elemente in allen spezifischen Fragmenten. Für trichomexprimierte Gene wurden bereits MYB-Bindungsstellen als wichtig für die spezifische Expression beschrieben, beispielsweise in dem *LTP3*- und *RDL1*-Promotor von Baumwolle, dem *CYP71D16*-Promotor von Tabak und dem *AtCYS3A*-Promotor von *Arabidopsis thaliana* (Gutierrez-Alcala *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004). Diese Gene werden exprimiert, wenn das Trichom schon initiiert ist, so dass fraglich bleibt, ob diese Erkenntnis auf das sehr früh an der Initiation

beteiligte Gen *GL1* übertragen werden kann. Für eine Regulation durch MYB-Faktoren spricht aber zusätzlich, dass das erste Intron von *GL1*, *WER* und *GaMYB2* (*GaMYB2* wird sehr früh in sich entwickelnden Baumwollfasern/ -trichomen exprimiert) ebenfalls eine MYB-Bindungsstelle enthält, die wahrscheinlich für die verstärkende Funktion der Introns verantwortlich ist (Wang *et al.*, 2004). Allerdings stellen MYB-Bindungsstelle dieser Introns MYB2AT- bzw. MYBCORE-Elemente dar, während die hier untersuchten Regionen das MYB1AT-Element enthalten.

Direkt in die *GL1*-Regulation könnte das GL1-Protein involviert sein, das damit positive Rückkopplungsaktivierung ermöglichen kann. Der Verlust des GL1-Proteins in der trichomlosen *gll* Funktionsverlust Mutante zeigte keinen Effekt auf die ubiquitäre GUS-Expression in Blättern, die durch den 5'-Promotor in Kombination mit 3'-Enhancer von *GL1* (Kirik *et al.*, 2005) oder durch den 3'-Enhancer bzw. durch das mittlere, essentielle Fragment-30 des 3'-Enhancers dirigiert wurde (s. Abb. 54). Für das Fragment-32 des 3'-Enhancers konnte dagegen in der *gll* Mutante keine Expression mehr detektiert werden. Da das Fragment-32 des 3'-Enhancers die Expression im Wildtyp nur in Trichome dirigiert, ist die Abwesenheit von Expression in einer trichomlosen Mutante jedoch zu erwarten. Das Fragment-28 und der 5'-Promotor des *GL1*-Gens vermittelten im Wildtyp neben der Trichomexpression auch ubiquitäre Expression in den Blättern. Diese war in der *gll* Mutante ganz verschwunden. GL1 kann folglich die Expression von *GL1*, die über das Fragment-30 vermittelt wird und für die Musterbildung grundlegend ist, über den 5'-Promotor oder das Fragment-28 von *GL1* modulieren. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass für den 5'-Promotor bereits verstärkende Funktion auf die Rettungseffizienz des 3'-Enhancers und des Fragments-30 nachgewiesen werden konnte, und die Kombination von Fragment-28 mit Fragment-30 und dem 5'-Promotor zu einer weiteren Verstärkung führte. Der 5'-Promotor alleine kann aber kaum und das Fragment-28 keine Trichome initiieren. Auf diese Weise würde die Regulation durch das Subfragment-30 zuerst GL1-unabhängige Expression von *GL1* ermöglichen, und das exprimierte GL1-Protein dann ein Faktor seiner eigenen Hochregulation sein. Damit ist ein erster Anhaltspunkt für die bisher hypothetische, positive Feedback-Regulation des Aktivators der Trichom-Musterbildung gefunden. Eine Verstärkung der bereits existierenden, spezifischen Expression ist auch sinnvoll, da im postulierten Aktivator-Inhibitor-Modell der Trichom-Musterbildung eine frühe Expression des Aktivators in der ganzen Epidermis angenommen wird, die durch statistische Fluktuationen zu lokalen Konzentrationserhöhungen führt, und dann in den Trichomvorläuferzellen selbstregulatorisch immer mehr verstärkt wird (Schnittger *et al.*, 1999). Mit welchem DNA-Motiv GL1 interagiert und ob das GL1 Protein überhaupt selbst an die regulatorische Regionen bindet, oder ob ein bisher unbekannter Faktor durch GL1 aktiviert wird und dann die *GL1*-Expression vermittelt, ist wichtig zu klären. Möglicherweise kann über diesen Weg auch die Inhibition des Aktivators durch den Inhibitor durchgeführt werden. Der Verlust des

TRY-Gens führt zur Bildung von Trichomnestern, sowie ektopischen Trichomen auf Kotyledonen, Infloreszenzen und floralen Organen. Außerdem führt der Verlust von *TRY* in Kombination mit der ektopischen Expression von *GL1* zur Entstehung von Trichomen in der Subepidermis (Schnittger *et al.*, 1998; Szymanski und Marks, 1998), so dass eine Inhibition der *GL1*-Expression durch *TRY* angenommen werden kann. Die Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle an dem bHLH-Protein GL3 im Hefe-Zwei-Hybrid-System (Esch *et al.*, 2003) ist ein Hinweis auf einen möglichen Konkurrenzmechanismus dieser beiden Proteine.

Aufgrund der Entdeckung von GeBP als *GL1*-Enhancer bindendes Protein (es wurde durch Ein-Hybrid-Suche mit der Sequenz des Subfragments-30 identifiziert) und seiner Expression in dem vegetativen Meristem und den jungen Blattprimordien (Curaba *et al.*, 2003), ist ein Einfluss von GeBP auf die *GL1*-Expression durchaus denkbar. Für *GL1* und GeBP wurde des Weiteren eine schwache Interaktion im Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt (Herrmann, 2002). 35S::*GeBP* Pflanzen zeigten gegenüber dem Wildtyp (im homozygoten Zustand) mehr Trichome auf den ersten beiden Blättern, so dass ein schwacher Effekt von GeBP auf die Trichominitiation messbar ist, obwohl kein signifikanter Anstieg der *GL1*-Expression durch RT-PCR festgestellt wurde (Curaba *et al.*, 2003). In 35S::*GL1* Pflanzen sind die Trichome hauptsächlich auf die Ränder der Rosettenblätter begrenzt (Larkin *et al.*, 1994). Es konnte bei der kombinierten Überexpression der Gene *GL1* und *GeBP* eine Zunahme der Trichomzahl gegenüber den 35S::*GL1*-Pflanzen festgestellt werden, wobei aber das 35S::*GL1*-Muster erhalten blieb, so dass der Anstieg der Trichomanzahl einen Effekt der Überexpression von 35S::*GeBP* darstellt. Der Wegfall von GeBP in der Mutante GT6658 besitzt allerdings keinen Einfluss auf die Trichominitiation und –Musterbildung, wie der Vergleich der Trichomanzahl in der Mutante mit dem Wildtyp demonstrierte, und auch die *GL1*-Expression war in RT-PCR-Analysen nicht signifikant verändert (Curaba *et al.*, 2003). Da drei ähnliche Gene zu *GeBP* im *Arabidopsis* Genom existieren (Curaba *et al.*, 2003), könnte der fehlende Phänotyp der Mutante auf Redundanz basieren, was durch Mehrfach-Mutanten zu testen wäre. Die stabile Überexpression von *GeBP* vermittelte jedoch eine frühere Aufhebung der intensiven, basalen Expression in älteren Blättern und ektopische Expression in den Kotyledonen. Damit könnte GeBP möglicherweise aktivierende und auch negative Funktion für die *GL1*-Expression übernehmen, die von dem jeweiligen entwicklungsbiologischen bzw. gewebe-spezifischen Kontext abhängig ist. Eine transiente Interaktion von GeBP mit *GL1* oder von GeBP mit dem Aktivatorkomplex reichte aber nicht aus, um die Expression in den Kotyledonen zu aktivieren, so dass GeBP wahrscheinlich mit weiteren Faktoren interagieren muss, um die ektopische Aktivierung bei stabiler Überexpression von *GeBP* in den Kotyledonen zu ermöglichen. Erste vorläufige Beobachtungen zeigten, dass 35S::*GeBP*-Pflanzen im Gegensatz zu wildtypischen Pflanzen phänotypisch z.B. in der Blattexpansion und Sprossachsenlänge verändert sind und damit

dem Erscheinungsbild von GA-Überdosierung oder konstitutiven GA-Mutanten (z.B. *spindly*, Jacobsen und Olszewski, 1993) ähneln. Eine detaillierte Untersuchung der damit verbundenen Charakteristika (Sun und Gubler, 2004; Wen und Chang, 2002), wie Verlängerung der Sprossachse und der Petiolen, verstärkte Blattexpansion, verfrühte Blühzeit, Veränderung der Apikaldominanz und des Blattchlorophyllgehaltes steht für die Zukunft an. Damit steht GeBP möglicherweise im Zusammenhang mit der GA-Regulation von *GL1*. Eine Überprüfung der Trichominitiation und *GL1*-Expression in 35S::GeBP Pflanzen in Abwesenheit von GA (Zugabe von Paclobutrazol) wäre folglich empfehlenswert, um zu überprüfen, ob die GA-Abhängigkeit durch GeBP vermittelt wird. In diesem Fall würde man *GL1*-Expression und Trichominitiation trotz GA-Inhibitor in 35S::GeBP Pflanzen erwarten.

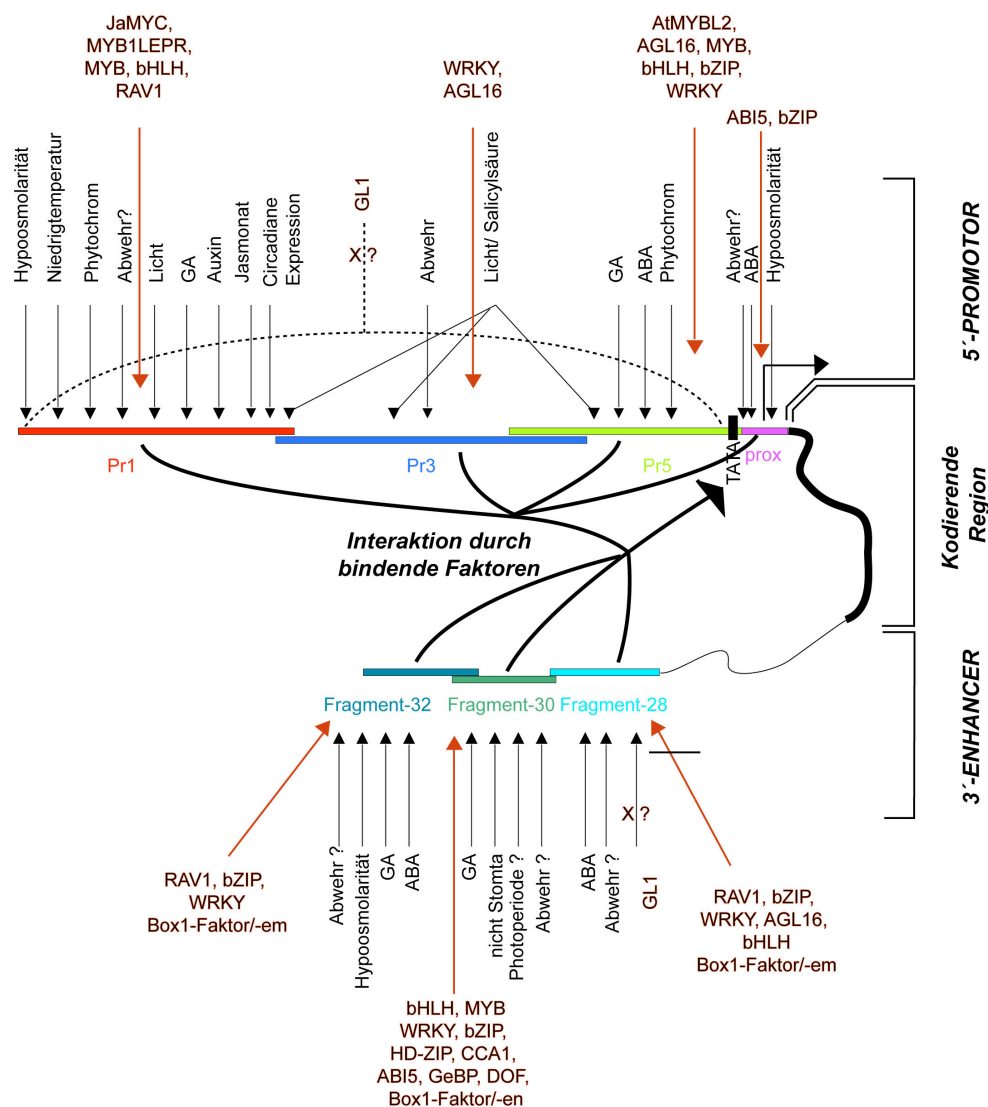


Abbildung 119: Modell zur transkriptionellen Regulation des *GL1*-Gens

Zusammenfassende Darstellung der regulatorischen Bereiche von *GL1* in der genomischen Anordnung: Pr1, Pr3, Pr5 des 5'-Promotors, des proximalen Enhancers (prox) und der Fragmente des 3'-Enhancers Fragment-28, Fragment-30 und Fragment-32 mit den möglichen, übergeordneten Signaltransduktionswegen und möglichen, bindenden Faktoren (braun). Das gesamte Gen von *GL1* bildet eine sterische Schleife aus, um die Interaktion der verschiedenen, regulatorischen Bereiche und die Interaktion zur TATA-Box über die bindenden Faktoren zu ermöglichen und damit die Transkription (abgeknickter Pfeil) zu regulieren.

Ein Modell der möglichen, komplexen, übergeordneten Regulationswege für *GL1* ist in Abb. 119 mit den möglichen zurzeit bekannten Faktoren und funktionalen Zusammenhängen dargestellt.

3.2.8 *Mutmaßliche, transagierende Faktoren der regulatorischen Sequenzen von WER*

Betrachtet man die untersuchten, regulatorischen Bereiche des *WER*-Gens, so stellt man, wie für das *GL1*-Gen, das wiederholte Vorkommen von cis-regulatorischen Elementen fest (s. Abb. 72), die die Funktion verschiedener Signaltransduktionswege vermitteln könnten.

Das Phytohormon Abscisinsäure ist bisher der einzige, bekannte Regulator, der das Muster der Wurzelhaare früh beeinflussen kann, da die Abwesenheit von ABA das Muster der *GL2*-Expression bereits in der meristematischen Zone völlig zerstört (van Hengel *et al.*, 2004). Ob andere Signaltransduktionswege auch Einfluss nehmen können, bleibt noch zu überprüfen. Für die ABA-Signaltransduktion sprechen zum einen viele ACGT-Boxen und ABREs und zum anderen einige DPBFCOREDCDC3-Elemente als Bindungsstelle für AtDPBFs (wie ABI5), sowie eine G-BOX (CACGTGMOTIF) und das Vorhandensein von vielen MYB1AT sowie MYCATERD1-Elementen. AtMYC2 und AtMYB2, die an diesen beiden Elementen binden, interagieren miteinander und vermitteln die Abscisinsäure- und Trockenstress-abhängige Expression des Gens *RD22* (Abe *et al.*, 2003a; Abe *et al.*, 1997).

Die Elemente der regulatorischen Bereiche von *WER* weisen jedoch auf die Funktion weiterer Phytohormone hin: Durch die Identifikation von GAREs in dem 5'-Promotorfragment Pr18 und im 3'-Bereich und von Pyrimidin-Boxen im Fragment Pr19 und im 3'-Bereich gibt es Hinweise für GA-Regulation. Eine Rolle von GA ist bisher aber für die Wurzelhaarinitiation nicht bekannt. Ein Auxin-abhängiges Element (ARFAT) und ein Ethylen-abhängiges Element (ERELEE4) konnten im Fragment Pr20 bzw. in dem überlappendem Bereich von Pr18/ Pr19 gefunden werden. Für die Wurzelhaar-Bildung konnte gezeigt werden, dass die Phytohormone Auxin und Ethylen einen Einfluss auf die Wurzelhaar-Initiation aufweisen: ihre Wirkung setzt zwar erst nach der frühen Musterbildung ein, führt aber trotzdem zu einer Zunahme von Wurzelhaaren (Masucci und Schiefelbein, 1994; Tanimoto *et al.*, 1995). Zwei LTREs finden sich in Pr20, die verantwortlich für Niedrigtemperaturantwort sind. Für involvierte Lichtregulation sprechen identifizierte TBOXATGAPB- und GT1CONSENSUS-Elemente in allen Fragmenten und das in einigen Fragmenten vorkommende Element IBOXCORE und das Phytochrom regulierte Element REALPHALGLHCB21. Antwort auf Hypoosmolarität könnte durch das Element PREATPRODHD vermittelt werden. Elemente im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr können auch zahlreich identifiziert werden: W-Boxen, SEBFCONSSTPR10A und SP8BFIBSP8BIB, sowie die durch Salicylsäure induzierbaren GT1-Elemente. Damit können fast alle Signaltransduktionswege, die bei

der *GLI*-Regulation eine Rolle spielen könnten, auch für die *WER*-Regulation wiedergefunden werden.

Organ- und gewebespezifische Faktoren, die die Initiation und Modulation der Wurzelhaar-Musterbildung beeinflussen, sind bisher kaum bekannt (Schiefelbein, 2003). Zum einen finden sich in Pr20 mehrere Elemente des gleichen CArG-Box-Typs (CARGCW8GAT) wie in *GLI*, die auch hier einen Hinweis auf die Regulation durch AGL16 liefern könnten, das ein zellreihenspezifisches Expressionsmuster in der Primärwurzel aufweist und in den Schließzellen exprimiert wird (s. 3.2.7). Das wiederholte Auftreten des Schließzellen spezifischen Elements TAAAGSTKST1, könnte einen Hinweis auf die Stomata-Musterbildung im Hypokotyl liefern, in die *WER* involviert ist (Lee und Schiefelbein, 1999). Das Element P1BS im 3'-Bereich ist für die Signaltransduktion von Phosphat-Mangel entdeckt worden (Rubio *et al.*, 2001). P1BS stellt damit eine interessante Verbindung zu der Phosphat-abhängigen Wurzelhaar-Initiation dar, da bei Phosphatmangel mehr Wurzelhaare gebildet werden und damit das Muster der Wurzelhaare verändert wird (Schmidt und Schikora, 2001). Interessant scheint auch das Element WUSATAg, das für die Bindung des Proteins WUSCHEL in dem Gen *AGAMOUS* verantwortlich ist. Da für das Gen *WOX5* (*WUSCHEL HOMEODOMAIN*) gezeigt wurde, dass es in der embryonalen Wurzel exprimiert wird (Haecker *et al.*, 2004), könnte ein solches Homeobox-Protein durchaus an der Wurzelhaar- Musterbildung beteiligt sein, die bereits früh in der embryonalen Phase mit der spezifischen Expression von *WER* verbunden ist (Lin und Schiefelbein, 2001). Des weiteren fällt das häufige Vorkommen von MYB1AT und MYCATRD1 Bindungsstellen auf, wobei auch für das *GLI*-Gen vielfach das MYB1AT-Element identifiziert wurde, so dass man auch hier wieder vergleichbare Interaktion zwischen MYB- und bHLH-Faktoren annehmen kann.

Das Promotorfragment Pr20 des 5'-Promotors des *WER*-Gens zeigte die intensivste GUS-Färbung, so dass es möglicherweise den Hauptanteil der regulatorischen Information zur Musterbildung trägt. Dies kann natürlich erst durch Rettungsanalysen bestätigt werden.

Der distale Teil von Pr20 trägt vermutlich keine *WER*-relevante Information, da dessen Deletion in dem Fragment Pr59 keine Veränderung der GUS-Expression verursachte. Die folgende Nukleotidabfolge bis zum Beginn des Deletionsfragments Pr60 bewirkte eine Reduktion der Expression. Der deletierte Bereich (orange Domäne, Abb. 71) beinhaltet die WUS-Bindungsstelle (WUSATAg) und eine MYB-Bindungsstelle (MYB1AT, MYB1LEPR, MYBATRD22). Die WUS-Bindungsstelle wurde allerdings auch in der Deletion Pr59 zerschnitten, so dass sie für Pr20 keine Bedeutung haben sollte. Der Verlust desselben Sequenzbereiches (orange Domäne, Abb. 71) führte auch in Pr53 (Deletion des mittleren Fragments Pr19) zur Reduktion der Expressionsstärke. Daraus folgt, dass die MYB-Bindungsstelle für Pr20 und Pr19 eine verstärkende Funktion haben sollte. Ob die WUS-Bindungsstelle eine Funktion für Pr19 besitzt, bleibt noch zu klären.

Die Sequenz von Beginn des Fragments Pr60 bis zum Anfang von Pr61 (Deletionen von Pr20) beinhaltet zwei benachbarte MYB-Bindungsstellen (MYB2AT und MYBST1). Dieser Bereich ist von keiner Bedeutung für die Wurzelexpression, da sowohl dessen Deletion in dem Fragment Pr60 zu Pr61 als auch die Deletion in Pr52 zu Pr53 (Deletionen von Pr19) keine Veränderung in der GUS-Expression hervorrief.

Die Sequenz von Pr61 (rote Domäne, Abb. 71) vermittelte deutliche GUS-Expression in Zellreihen der Wurzelepidermis von der meristematischen bis weit in die Elongationszone, so dass sie die regulatorische Information für dieses Expressionsmuster beinhalten muss. Fortschreitende Deletionen des Fragments Pr61 könnten den Bereich weiter eingrenzen. Die hier zu identifizieren Elemente geben keinen konkreten Hinweis. Man kann ein ACGT-Element, ein Auxin-abhängiges Element, zwei CArG-Boxen, drei AtDPBF-Bindungsstellen, drei GT1-Elemente, zwei LTREs, drei MYC-, MYB-, eine SP8-Bindungsstelle, eine T-Box und drei W-Boxen identifizieren. Hinweise auf Zell- oder Gewebespezifität könnten die beiden Elemente CIANDIANLELHC, das auch im 5'-Promotor von *GL1* gefunden wurde, und eine HD-ZIP-Bindungsstelle (HDZIPATATHB2) darstellen. Ob circadiane Expression für *WER* oder *GL1* eine Rolle spielt, ist unklar. Sie könnte aber statistische Konzentrationsfluktuationen erzeugen, die für die frühe Musterbildung postuliert wurden. Für die HD-ZIP-Bindungsstelle wurde gezeigt, dass sie zwischen -72 und -80 im Promotor von *ATHB2* lokalisiert und durch Lichtsignale zur Autoregulation dient (Ohgishi *et al.*, 2001). Offen bleibt die Frage, wie die Positionsabhängigkeit der Wurzelhaare reguliert wird. Spielt AGL16 vielleicht eine Rolle, da es schon ein Vormuster liefert? Um dies zu klären, müssen zunächst die genetischen Beziehungen von *WER* und *AGL16* geklärt werden.

Folglich kann auch für das *WER*-Gen eine ähnlich komplexe Regulation wie für das *GL1*-Gen angenommen werden. Auffällig ist das Auftreten von vielen identischen Elementen in den beiden regulatorischen Bereichen dieser homologen Gene, die aber nicht in derselben Anordnung vorliegen.

3.2.9 Gemeinsamkeiten der regulatorischen Regionen von *GL1*, *WER*, *GL2*, *AtML1* und *AtMYB23*

Vergleicht man die regulatorischen Bereiche von *GL1* und *WER* mit denen von *GL2* und *AtML1*, die in der Lage waren die Expression von *GL1* für eine sehr guter Rettung der *gl1* Mutante zu vermitteln, sowie mit *AtMYB23*, das Redundanz zu *GL1* und *WER* zeigt, so wiederholt sich hier das Auftreten von Elementen, die Verbindung zu vielen Signaltransduktionswegen zeigen (s. Tab. 13). Dies spricht für einen vergleichbaren, komplexen Regulationsmechanismus dieser Gene. Auffällig ist, dass für *GL1* u. a. die Elemente GARE2OSREP1 und ATHB1ATCONSENSUS sowie für *WER* die Elemente HDZIPATATHB2 und MYBATRD22 spezifisch sind. Sie könnten also auch Bindung

zu wichtigen MYB- bzw. HD-ZIP- Faktoren liefern, die die Expression spezifisch beeinflussen. Auch die Elemente für CCA1 und das Element CAREOSREP1 sowie CATATGGMSAUR15, die in allen Promotoren außer in den regulatorischen Bereichen des *WER*-Gens auftreten, könnten die Expression im Blatt vermitteln.

Interessant ist, dass der *GL2*- und der *AtML1*-Promotor die *gll* Rettung mit der *GL1* cDNA vermitteln können, die besser als mit dem 5'-Promotor und 3'-Enhancer von *GL1* ist. Beide zeigen ein ähnliches GUS-Expressionsmuster wie *GL1*, und sind nah verwandte Proteine (Sessions *et al.*, 1999; Szymanski *et al.*, 1998a). Aufgrund der Expressionsdaten könnten teilweise vergleichbare, übergeordnete Regulationsmechanismen zwischen *AtML1/ GL2* und *GL1* angenommen werden. Die Rettung durch den *GL2*-Promotor gibt dem Gen *GL2* eine andere Stellung innerhalb der Musterbildungshierarchie. Bisher wurde dieses Gen vorwiegend unterhalb des Aktivator-Komplexes positioniert (Hülkamp *et al.*, 1994; Rerie *et al.*, 1994). Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass *GL2* auch in *gll* und *tgg1* Funktionsverlust-Mutanten exprimiert wird, so dass dem Aktivator-Komplex die Rolle zukommt, bestimmte Aspekte der *GL2*-Expression zu regulieren (Szymanski *et al.*, 1998a). Es gibt allerdings Untersuchungen, die ihm bereits eine Rolle parallel zu den Genen *GL1/ WER*, *GL3*, *EGL3* und *TTG1* direkt in der Musterbildung zuweisen (Johnson *et al.*, 2002; Ohashi *et al.*, 2002). Durch den hier durchgeführten Promotoraustausch kann eine wichtige Rolle für *GL2* innerhalb der Musterbildung angenommen werden, da sein Expressionsmuster das von *GL1* reflektiert und damit seine Aktivität schon vor der Etablierung des Trichomschicksals vorhanden ist und alle Kriterien für die räumlich-zeitlich Expression des Aktivators trägt. Eine Rolle als Aktivator konnte bei den Untersuchungen des *TRY*-Promotors bestätigt werden (s. 3.3.4). *AtML1* wird bereits in der Protodermis des sich entwickelnden Embryos exprimiert und bleibt auch in der Epidermis des Blattes und in Trichomen exprimiert (Sessions *et al.*, 1999). Mutanten sind zurzeit noch nicht charakterisiert, so dass unklar ist, ob *AtML1* für die Trichom-Musterbildung eine Funktion übernimmt.

GL1, *WER* und *AtMYB23* können phylogenetisch in einem Ast lokalisiert werden (Lee und Schiefelbein, 1999). *AtMYB23* wird auch in den Trichomen exprimiert und kontrolliert zusammen mit *GL1* die Regulation der Trichominitiation. Die Proteine der beiden Gene sind für die Trichominitiation funktional äquivalent, aber die transkriptionelle Regulation unterscheidet sich (Kirik *et al.*, 2005). Es müssen folglich Unterschiede in den regulatorischen Bereichen vorliegen. Dem Promotor (hier 2 kb) von *MYB23* fehlen gegenüber den regulatorischen Bereichen von *GL1* das ABA abhängige Element G-Box, die Niedrigtemperatur abhängigen Elemente LTREs, die Bindungsstellen für ATHB1, und die in die GA-Regulation involvierte Pyrimidin-Box, die in der *GL1*-Regulation möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen. Alle anderen Elemente können in den regulatorischen Bereichen beider Gene gefunden werden. Eine detaillierte Untersuchung der

Promotoren der drei homologen Gene *GL1*, *WER* und *AtMYB23* wurde an dieser Stelle nicht unternommen, da die regulatorische Region von *MYB23* dazu zuerst funktional eingeschränkt werden sollte.

3.3 Die Regulation von *TRIPTYCHON* und *CAPRICE*

Das *TRIPTYCHON*- und das *CAPRICE*-Gen kodieren für Inhibitoren der Trichom- bzw. Wurzelhaar-Musterbildung. Damit sollte ihre Expression laut dem Musterbildungsmodell von den Komponenten des Aktivatorkomplexes positiv beeinflusst werden und sowie diese und sich selber inhibieren. Sie werden in der gesamten, jungen Blattepidermis exprimiert, und ihre Expression beschränkt sich bei zunehmender Reifung auf die Trichome. In der Wurzelepidermis sollten sie nur in den Nicht-Wurzelhaarzellen exprimiert werden, dies trifft für *CPC* zu. *TRY* kann nur in der *cpc try* Funktionsverlust-Doppelmutante in der Wurzelepidermis in einem fleckigen Muster lokalisiert werden, was dem gestörten Zellreihenmuster der Doppelmutante entspricht (Schellmann *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 1997).

3.3.1 Eine Minimalregion und ein Enhancer für die Regulation der *TRY*-Expression

Für *TRY* war bereits die 1,4 kb große untranslatierte 5'-Region als charakteristische Expressionsdomäne beschrieben (Schellmann *et al.*, 2002). Die eigenen Promotoruntersuchungen zeigten, dass diese Region wesentlich weiter eingeschränkt werden kann. Dabei wurde eine proximale Domäne (-176 bis -4) entdeckt, die alleine keine Expression lieferte, aber unbedingt notwendig war, um die beschriebene Expressionsstärke des 5'-Promotors zu ermöglichen. Nur wenn dieser Bereich vorhanden war, konnte die ubiquitäre und später basale Expression der Blätter, sowie die starke, lang anhaltende Trichomexpression gefunden werden. Damit kommt ihre eine verstärkende Funktion zu, und sie soll deshalb vorläufig als proximaler Enhancer bezeichnet werden. Die definierten Enhancer-Eigenschaften (Positions- und Richtungsunabhängigkeit; Banerji *et al.*, 1981) müssen aber noch überprüft werden.

Ein spezifischer Bereich konnte für die *TRY*-Expression in dem Bereich von -623 bis -176 (Pr15) entdeckt werden. Diese Domäne vermittelte dieselbe GUS-Expression wie der gesamte 5'-Promotor und ebenso die Abhängigkeit von dem proximalen Enhancer (s. Abb. 78).

Die Expression, die durch den Gesamtpromotor (Pr16 + Fragment-33), sowie den Minimalpromotor (Pr15 mit dem proximalen Enhancer) vermittelt wurde, wurde ubiquitär im Blatt und in den Trichomen junger und alter Blättern der *cpc try* Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp verstärkt. Der 5'-Promotor Pr16 bzw. Pr15 ohne den proximalen Enhancer konnte in Abwesenheit der Inhibitoren *CPC* und *TRY* im Gegensatz zum Wildtyp auch ubiquitäre Expression dem Blatt liefern, und die Expression wurde in den älteren Trichomen länger aufrecht erhalten. Daraus wird

ersichtlich, dass der 5'-Promotor bzw. das Fragment Pr15 allein auch die Information für die ubiquitäre Blattexpression tragen, die aber durch TRY oder CPC vollständig inhibiert wird. Folglich müssen die Inhibitoren TRY oder CPC die *TRY*-Expression im Wildtyp reduzieren. Diese Inhibition wird aber über den proximalen Enhancer abgeschwächt.

Für die Rettungseffizienz zeigte sich, dass Pr15 in Kombination mit dem proximalen Enhancer mittels *TRY*-cDNA eine gute Rettung des Musterbildungsdefektes der *try* und *cpc try* Mutanten verursachte. Außerdem konnte auch die wildtypische Dreifachverzweigung der Trichome in der *try* Mutante wieder hergestellt werden. Unter den vielen Phänotypen konnten Linien gefunden werden, die eine vollständige Rettung zeigten, d.h. keine Nester und ausschließlich 3-verzweigte Trichome. Die Rettungseffizienz von Pr15 und dem proximalen Enhancer stimmte außerdem mit der Qualität der bereits veröffentlichten Rettung der *try* Mutante mit dem 5'-Promotor und der *TRY*-cDNA überein (Schellmann, 2001). Dort wurde für zwei gerettete Linien eine Nestfrequenz von 0,3 bzw. 1% beschrieben. Damit beinhaltet Pr15 in Kombination mit dem proximalen Enhancer die vollständige, regulatorische Information für die *TRY*-Expression im Rosettenblatt und soll hier als Minimalpromotor definiert werden. Leider konnten als Kontrolle mit dem gesamten 5'-Promotor (Pr16+Fragment-33) für die *try* Rettung keine, und für die *cpc try* Rettung nur wenige transformierte Linien gewonnen werden.

Eine weitere Eingrenzung (s. Abb. 78) des *TRY*-Promotors auf den Bereich von -424 bis -176 (Pr23) zeigte im Wildtyp Hintergrund nur noch Expression in den Trichomen von Phase 3 bis 5 (oder 6) (nach Szymanski, 2000). Die Kombination mit dem proximalen Enhancer führte zu keiner Änderung. Erst die Addition der Region von -623 bis -425 (Pr15, s.o.) konnte diese Expressionsdomäne sowohl zeitlich in den Trichomen, als auch gewebespezifisch erweitern, da dieser Sequenzbereich die ubiquitäre Blattexpression dirigierte, wenn der proximale Enhancer vorhanden war. Daraus muss man schließen, dass der proximale Enhancer zusammen mit der distalen Region (-623 bis -425) von Pr15 interagiert und diese Interaktion für die Blattexpression essentiell ist. In Abwesenheit der Inhibitoren TRY und CPC konnte für Pr23 zusammen mit dem proximalen Enhancer ubiquitäre Expression in jungen Blättern und in den Trichomen von Phase 1 bis 5 (oder 6) detektiert werden. Die ubiquitäre Expression im jungen Blatt und in den Trichomen der Phase 1-2 von Pr23 wird offenbar im Wildtyp durch TRY und CPC inhibiert. Ob Pr23 ohne proximalen Enhancer und in Abwesenheit der Inhibitoren auch in der Lage ist, diese beschriebene Expression zu zeigen, muss noch geklärt werden.

Bei der Untersuchung der Funktionalität des Fragments Pr23 kombiniert mit dem proximalen Enhancer ergab sich in der *try* Mutante keine Rettung. Erst durch die Untersuchung der *cpc try* Doppelmutante wurde aufgrund der besseren Rettungskriterien festgestellt, dass eine partielle, wenn auch nicht völlige Rettung der Trichom-Musterbildung möglich war, wie die Clusterfrequenz und

die Clusterzusammensetzung demonstrierte. Im Gegensatz dazu konnte allerdings keine Funktion von Pr23 für die Rettung der Trichomverzweigungszahl festgestellt werden, womit Pr23 im Gegensatz zu Pr15 folglich nicht die notwendige TRY-Inhibitorkonzentration zum richtigen Zeitpunkt für die Regulation der Trichomverzweigung steuert.

Die Expression von *TRY* wird im Wildtyp in der Wurzelepidermis vollständig unterbunden. Wenn die Inhibitoren TRY und CPC in der *cpc try* Doppelmutante eliminiert sind, kann allerdings Expression in der Wurzelepidermis der Primärwurzel nachgewiesen werden (Schellmann *et al.*, 2002). Ob beide Inhibitoren zusammen die Expression von *TRY* unterdrücken, oder nur ein Inhibitor diese Funktion übernimmt, muss noch geklärt werden. Die Existenz des Zellreihenmusters in der Wurzelepidermis ist aufgrund des Fehlens der Inhibitoren aufgelöst, d.h. es werden keine Wurzelhaare mehr gebildet (Schellmann *et al.*, 2002). Interessanter Weise findet man aber keine ubiquitäre Expression von *TRY*, sondern ein Zufallsmuster. Dieses Zufallsmuster könnte auf eine frühe zufällige Determination zu Wurzelhaar- und Nicht-Wurzelhaar-Schicksal in Abwesenheit der Inhibitoren hindeuten, während das Fehlen von Wurzelhaaren erst anschließend in der fehlenden Funktion der Inhibitoren bei der frühen Differenzierung die Ursache finden würde. Damit wäre das Phänomen der fleckenartigen *TRY*-Expression in der haarlosen Wurzelepidermis auf fehlende Funktionen der Inhibitoren zum einen bei der Determination und zum anderen bei der Differenzierung zurückzuführen. Die Untersuchung der Lokalisation der *GL2*-Expression, die ein frühes Resultat der Determination des Zellschicksals „Nicht-Wurzelhaar“ in der Wurzelepidermis darstellt (Masucci *et al.*, 1996), könnte Aufschluss darüber geben. Ein fleckenartiges Zufallsmuster für die *GL2*-Expression findet man z.B. in den Pflanzen 35S::WER, 35S::WER *wer-1*, 35S::WER *wer-1 cpc-1* in zunehmendem Maße (Lee und Schiefelbein, 2002), sowie in der *scm* Mutante (die LRR-Kinase *SCRAMBLED* vermittelt möglicherweise ein positionelles Signal für die Wurzelhaarmusterbildung; Kwak *et al.*, 2004) und in Abwesenheit von ABA (van Hengel *et al.*, 2004), wobei in allen Fällen eine drastische Veränderung der Musterbildung der Wurzelepidermis auftritt.

Für die *cpc* Mutante wurde Expression von *GL2* nicht nur in der Nicht-Wurzelhaarposition (definiert durch die Lage zu den darunterliegenden Kortexzellen), sondern auch ektopische Expression in der Wurzelhaar-Position gefunden (Lee und Schiefelbein, 2002), was man bei dem Wegfall des Inhibitors der Musterbildung erwartet. Wenn die obige Annahme zutrifft, sollte die *cpc try* Mutante wie für die *TRY*-Expression auch ein zufälliges *GL2*-Expressionsmuster aufweisen. Damit wäre die Rolle von *TRY* allerdings nicht nur in Redundanz zu *CPC* zu sehen, sondern der Verlust von *TRY* würde zu einer Veränderung der Qualität der Musterbildung führen, da die Positionsabhängigkeit von den unterliegenden Kortexzellen aufgehoben würde, was in der *cpc* Einzelmutante nicht stattfindet.

Dieses *TRY*-Expressionsmuster in der Wurzelepidermis konnte sowohl für den 5'-Promotor (Pr16 und proximaler Enhancer) als auch für den *TRY*-Minimalpromotor (Pr15 und proximaler Enhancer) bestätigt werden (s. Abb. 78), so dass der Minimalpromotor auch alle regulatorische Information für die Expression in der Wurzelepidermis trägt. Die Expression ohne den proximalen Enhancer konnte in der Epidermis der Primärwurzel der *cpc try* Mutante nicht detektiert werden, weshalb der Enhancer essentielle Information für diese *TRY*-Expressionsdomäne beinhalten muss. Da in der *cpc try* Doppelmutante für Pr23 mit dem proximalen Enhancer keine Expression in der Epidermis der Primärwurzel festgestellt werden konnte, lässt sich daraus schließen, dass auch die Anwesenheit der distalen Sequenz von Pr15, wie auch des proximalen Enhancers, essentiell für die epidermale Wurzelexpression ist.

Hier konnte des Weiteren festgestellt werden, dass die beiden Faktoren *TRY* und *CPC* die *TRY*-Expression in der Seitenwurzel unterdrücken: In der *cpc try* Doppelmutante konnte für den *TRY* 5'-Promotor und den Minimalpromotor (Pr16/ Pr15 jeweils mit Fragment-33) GUS-Expression in den Gründerzellen der Seitenwurzeln festgestellt werden, die auch beim Auswachsen erhalten blieb. Diese Expression ging sowohl bei der Entfernung des distalen Bereichs von Pr15 zu Pr23 als auch durch die Abwesenheit des proximalen Enhancers verloren. Aufgrund der Existenz der *TRY*-Expression bei der Seitenwurzelinitiation könnte *TRY* neben der epidermalen Funktion bei der Wurzelhaar-Musterbildung auch eine Rolle in der Seitenwurzelausbildung zukommen. Für die Seitenwurzelinitiation wurden *KNAT6*, Auxin-abhängige Faktoren, wie z.B. *NAC1*, und *ALF-4* als positive Faktoren beschrieben (Casimiro *et al.*, 2001; Celenza *et al.*, 1995; Dean *et al.*, 2004; Malamy und Benfey, 1997; Montiel *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2000). Bisher wurden aber keine Faktoren, die z.B. einen minimalen Abstand zwischen den Seitenwurzeln regulieren, veröffentlicht, so dass *TRY* eventuell in Kombination mit anderen Faktoren eine Funktion als Inhibitor zukommen kann. Durch die Analyse der Seitenwurzelfrequenz in der *try* Mutante und *cpc try* Doppelmutante muss dieser Zusammenhang aber noch detailliert untersucht werden. Die *TRY*-Funktion besteht möglicher Weise auch hier, wie bei der Wurzelhaar-Differenzierung, in Redundanz zu *CPC*, da die *TRY*-Expression in der Seitenwurzel nur in der *cpc try* Doppelmutante aber nicht im Wildtyp lokalisiert werden kann. Eine mögliche Rolle des *CPC*-Gens für die Seitenwurzelbildung ist zurzeit ebenfalls nicht untersucht.

Zusammenfassend kann man erkennen, dass die regulatorische Information für die *TRY*-Expression in den Rosettenblättern, in der Wurzelepidermis, bei der Seitenwurzel-Initiation und beim Seitenwurzelauswachsen im selben Minimalpromotor lokalisiert werden kann. Die Abwesenheit des distalen Bereichs von Pr15 führt zu Defiziten in der Funktionalität von *TRY* und kann auf das Fehlen der ubiquitären Blattexpression und den begrenzten Zeitraum der Trichomexpression, sowie die Reduktion der Expressionsstärke in den Trichomen zurückgeführt werden. Dies spricht für

synergistische Interaktionen von bindenden Faktoren an den gesamten Promotorbereich von -623 bis -4, durch welche die korrekte *TRY*-Expression ermöglicht wird.

3.3.2 Erklärungen für die verstärkende Funktion des proximalen Enhancers von *TRY*

Die Analyse des proximalen Enhancers zeigte, dass er 38 Nukleotide vor der 5'-UTR startet, die durch 5'-RACE identifiziert wurde (Schellmann *et al.*, 2002). Eine TATA-Box kann im 5'-Bereich von *TRY* nicht identifiziert werden, so dass eine andere Sequenz im *TRY*-Promotor als Kernpromotor genutzt wird, da nicht jedes Gen eine TATA-Box als Kernpromotor besitzt (Molina und Grotewold, 2005). Eine Erklärung, dass der Bereich der 5'-UTR posttranskriptionelle Stabilität verleiht und damit die Verstärkung durch den proximalen Enhancer verursacht, würde voraussetzen, dass der eigene Kernpromotor benutzt wird. Das würde dazu führen, dass die 5'-UTR inklusive 35S-Minimalpromotor vom jeweiligen Konstrukt transkribiert wird, was eher unwahrscheinlich ist. Um dies zu überprüfen, sollte man aber das Transkript analysieren.

Um die Interaktion des distalen Fragments von Pr15 und dem proximalen Enhancer zu verstehen, können die via PLACE identifizierten cis-regulatorischen Elemente als Anhaltspunkt genommen werden (s. Abb. 88). Betrachtet man den distalen Bereich von Pr15, der mit dem proximalen Enhancer interagiert, so kann hier ein GARE direkt benachbart zu einer Pyrimidin-Box identifiziert werden. Dieselbe Pyrimidin-Box findet man auch in dem Enhancer und in dem Fragment Pr23. Eine Regulation über GA wäre also vorstellbar, die auf der Interaktion der bindenden Faktoren der drei Pyrimidin-Boxen mit dem GARE basieren könnte, die für andere Gene bereits beschrieben wurde (Sun und Gubler, 2004). Es konnte hier gezeigt werden, dass die ubiquitäre Expression im Blatt und die starke Trichomexpression des *TRY*-Promotors eine Abhängigkeit von GA aufweist, die vergleichbar mit der Expressionsverstärkung durch den proximalen Enhancer ist. Diese GA-Abhängigkeit könnte verursachen, dass *TRY* und *GLI* durch GA koreguliert werden, um die Konzentration dieser beiden Gegenspieler gemeinsam in einem bestimmten, entwicklungsbiologischen Kontext aufrecht zu erhalten.

Außerdem könnte die PROLAMINBOX des proximalen Enhancers eine Rolle für die verstärkende Funktion desselben spielen. Sie wurde in dem *GLUB1*-Gen aus Reis identifiziert und liefert zusammen mit einem ACGT- und AACA-Motiv einen positiven, quantitativen Effekt (Wu *et al.*, 2000). Alle drei Motive können im proximalen Enhancer in nächster Umgebung gefunden werden, was einen vergleichbaren Mechanismus erlauben könnte.

Des Weiteren könnten die über das gesamte Fragment Pr15 und den proximalen Enhancer verstreuten GT1-Elemente, die im Zusammenhang mit Lichtregulation stehen (Zhou, 1999), eine integrative, lichtabhängige Regulation verursachen, die für GT1-Elemente angenommen wird (Chattopadhyay, *et al.*, 1998).

3.3.3 Regulation des distalen Fragments von *Pr15* von *TRY*

Betrachtet man die durch PLACE identifizierten Elemente des distalen Promotorfragments *Pr15* (s. Abb. 88), die außerhalb von *Pr23* lokalisiert sind, so fallen neben den bereits diskutierten GA involvierten Elementen die beiden MYB-Bindungsstellen auf. Diese MYB-Elemente sind von dem Typ MYBPLANT (MACCWAMC) und MYBPZM (CCWACC), deren unterstrichene Nukleotide identisch bzw. ineinander überführbar sind. Die konkreten Nukleotide der hier vorhandenen Elemente (CA)CCAAAC und CCAACC könnten somit denselben Faktor binden. Das Element MYBPLANT wurde in Promotoren der Phenylpropanoid-Biosynthesegene, wie *CHS*, identifiziert, deren Regulation durch MYB-, bHLH- und bZIP-Faktoren bestimmt wird (Hartmann *et al.*, 2005; Sablowski *et al.*, 1994). Das Element MYBPZM wurde durch die Bindung des MYB-Faktors P identifiziert. Das *P*-Gen kontrolliert die Phlobaphen-Pigmentierung in den floralen Organen von Mais und reguliert die Expression einer Gruppe von Genen, die an der Biosynthese der Flavonoide beteiligt ist (Grotewold *et al.*, 1994). Die Aktivierung dieser Gene durch das Protein P kann auch über den alternativen MYB-Faktor C1 in Kombination mit dem bHLH-Faktor R übernommen werden (Hernandez *et al.*, 2004). Parallelen zwischen der Regulation der Enzyme der Anthocyan-Biosynthese diverser Pflanzen und der Regulation der Trichom-/ Wurzelhaar-Musterbildung sowie der Regulation anderer *TTG1* involvierter Prozesse in *Arabidopsis* sind anzunehmen (Baudry *et al.*, 2004; Larkin *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003): Zum einen demonstrierte die Überexpression des R-Gens (bHLH) aus Mais in der trichomlosen *tgl* Mutante in *Arabidopsis* die Funktionalität eines orthologen Proteinaustauschs (Lloyd *et al.*, 1992), da das Trichom-Muster wieder ausgebildet wurde. Zum anderen spricht die immer wieder erkennbare Kombination der Faktoren für Parallelität und möglicher Weise gleiche Bindungsstellen.

Die *TRY*-Expression sollte laut dem Musterbildungsmodell durch die Komponenten des Aktivator-Komplexes, [MYB- (GL1/ WER), bHLH-Transkriptionsfaktoren (GL3/ EGL3), WD40-Protein (TTG1, das Proteininteraktionen vermittelt)] aktiviert werden können. Ob die Funktion der MYB-Faktoren GL1/ WER gegen P oder C1 (die P Funktion ist allerdings im Gegensatz zu der C1 Funktion unabhängig von einem bHLH-Faktor; Hernandez *et al.*, 2004) aus Mais ebenso austauschbar ist, bleibt noch zu testen. Dafür spricht, dass der Proteinaustausch der paralogenen Gene *GL1* und *WER* funktional ist (Lee und Schiefelbein, 2001). Damit könnten die beiden hier identifizierten MYB-Elemente MYBPLANT und MYBPZM die Bindungsstelle für das GL1-Protein in der Blattepidermis oder für das WER-Protein in der Wurzelepidermis sein.

Der Verlust des GL1-Proteins in der *gl1* Mutante führt zum vollständigen Verlust der *TRY*-Expression (persönliche Mitteilung von Swen Schellmann), womit seine Rolle als Aktivator für die *TRY*-Expression bekräftigt wird. Dass GL1 alleine die *TRY*-Expression reguliert, wäre denkbar, da das vergleichbare P1-Protein aus Mais ohne bHLH-Faktoren eine Aktivierung ermöglichen kann

(Hernandez *et al.*, 2004). Dies ist aber unwahrscheinlich, da die distale Sequenz von Pr15 ohne den proximalen Teil keine Aktivierung zeigte, wie das vorgelagerte Promotorfragment Pr14 des *TRY*-Promotors, das mit Pr15 in der Sequenz der beiden MYB-Elemente überlappt, demonstriert. Außerdem konnte das GL1-Protein alleine keine Induktion der *TRY*-Expression in mit 35S::GL1 transient transformierten Kotyledonen der TRY::GUS Pflanzen hervorrufen.

Da der Verlust des *GL3*-Gens nur noch zur *TRY*-Expression in den Trichomen und nicht mehr in der Musterbildungszone führt (persönliche Mitteilung von Swen Schellmann), muss eine Interaktion mit bHLH-Faktoren postuliert werden. Es kann angenommen werden, dass der Verlust beider bHLH-Faktoren GL3 und EGL3 zum vollständigen Verlust der *TRY*-Expression führen würde, da Redundanz der beiden Proteine aufgrund des Phänotyps der Doppelmutante *gl3 egl3* angenommen werden kann, da sie im Gegensatz zu der *gl3* Mutante vollständig nackte Blätter erzeugt (Zhang *et al.*, 2003). Auch die Aktivierung des Fragments Pr15 in den Kotyledonen bekräftigte durch die transiente Kotransformation mit 35S::GL1, 35S:GL3 und 35S::TTG die Annahme der Interaktion von GL1 und GL3/ EGL3 für die Aktivierung des *TRY*-Gens. Ebenso spricht für eine solche Interaktion, dass 35S::GL1 35S::GL3 Pflanzen deutlich mehr Trichome produzieren, als wildtypische Pflanzen oder die Überexpression der einzelnen Gene (Larkin *et al.*, 1994). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte die Interaktion bestätigt werden, sowie die Interaktion von EGL3 mit GL3, TTG1 und GL1 (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003). In dieser distalen Region von Pr15 können aber keine Bindungsstellen für bHLH-Transkriptionsfaktoren lokalisiert werden.

3.3.4 MYB-, bHLH- und HD-ZIP-Faktoren als Regulatoren des *TRY*-Gens

Im Gegensatz zu dem distalen Fragment von Pr15 konnten jedoch in dem Fragment Pr23, das Expression in den Trichomen aufweist, zwei MYC-Bindungsstellen mittels PLACE lokalisiert werden (s. Abb. 88), an die die beiden bHLH-Transkriptionsfaktoren GL3 und/ oder EGL3 binden könnten. Dadurch könnte auch die Interaktion zwischen dem Fragment Pr23 und dem distalen Bereich von Pr15 über MYB- und bHLH-Faktoren ermöglicht werden. Das Deletionsfragment Pr80 von Pr23 führt zum Verlust des ersten MYC-Elements und lieferte nur noch eine schwache GUS-Expression in den Trichomen. Der Verlust der zweiten MYC-Bindungsstelle im Fragment Pr108 führte zum vollständigen Verlust der GUS-Expression. Der Aktivator-Komplex aus GL1, GL3, EGL3 und TTG1, der für die Trichomininitiation postuliert wurde (Payne *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003), könnte folglich über die Bindung der MYB- und bHLH-Proteine die *TRY*-Expression vermitteln. TTG1 konnte durch Hefe-Zwei-Hybrid als interagierend mit GL3 charakterisiert werden (Payne *et al.*, 2000), und könnte durch Protein-Protein-Interaktionen über die WD40-Domäne interagieren. Wie sich gezeigt hat, muss 35S::TTG1 nicht kotransformiert werden, um die sehr

starke, transiente Expression durch GL1, GL2, und GL3 (s.u.) in den Kotyledonen zu vermitteln. Da *TTG1* Expression in den Kotyledonen nachweisbar ist (Bouyer, 2004), könnte die obige Unabhängigkeit der *TRY*-Expression von 35S::*TTG1* auf die endogene Expression von *TTG1* zurückgeführt werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch der HD-ZIP-Faktor GL2 eine Rolle für die *TRY*-Expression spielt, obwohl er zumeist als ein erstes Zielgen der Trichominitiation betrachtet und ihm primär eine Funktion für die Trichomdifferenzierung zugeschrieben wurde (Rerie *et al.*, 1994). Zum einen lieferte sowohl die transiente Kotransformation von 35S::GL2 mit den überexprimierten Komponenten des Aktivorkomplexes eine verstärkte *TRY*-Expression in den Kotyledonen und zum anderen war die *TRY*-Expression in der *gl2* Funktionsverlust-Mutante nur noch in den wenigen auswachsenden Trichomen in jungen Stadien zu detektieren, womit GL2 vor allem einen Aktivator für die basale Blattexpression von *TRY* darstellt. Die basale Blattexpression von *GL2* ist im Gegensatz zur Trichomexpression unabhängig von den Aktivatoren der Trichom-Musterbildung *GL1* und *TTG1* (Szymanski *et al.*, 1998), womit gerade der Verlust der basalen *GL2* Expression in der *gl2* Mutante auch zu dem Verlust der basalen *TRY*-Expression in *gl2* führen kann.

Der Verlust der Deletion von Pr23 zu Pr80 führte, wie oben beschrieben, zu einer Schwächung der Trichomexpression, die zum einen auf den bereits oben erwähnten Verlust der bHLH-Bindungsstelle zurückgeführt werden kann. Untersucht man die Sequenz des Fragments Pr23 aber genauer, so findet man das Motiv TAAATGAA, das eine Bindungsstelle für GL2 sein könnte: Das *GL2*-Gen ist homolog zu *AtML1* (Sessions *et al.*, 1999). Das Element für die Bindung des *AtML1*-Transkriptionsfaktors in z.B. dem *PDF1*-Gen ist die L1-Box (TAAATGYA) (Abe *et al.*, 2001). Für GL2 konnte in dem Gen *AtPDL ζ 1* die Bindung über das Element TAAATGTT gezeigt werden (Ohashi *et al.*, 2003), so dass das obige Motiv aus Pr23 als Bindungsstelle für GL2 in Frage kommt, was durch EMSA-Untersuchungen (Electrophoretic mobility shift assays) überprüft werden muss. Damit hätte GL2 aber auch neben der Funktion für die basalen Blattexpression auch eine verstärkende Rolle für die Trichomexpression.

Da *GL2* verstärkend auf die transiente Aktivierung der *TRY*-Expression durch die Komponenten des Aktivator-Komplexes in den Kotyledonen wirkt, ist eine Interaktion des *GL2*-Proteins mit diesen Faktoren anzunehmen. Damit würde auch der entscheidende Einfluss sowohl durch *GL1* und *GL3* als auch durch *GL2* für die basale Blattexpression von *TRY* verständlich. Eine Interaktion der Transkriptionsfaktoren *GL2* und *GL1* wird wahrscheinlich, wenn man die Beobachtung einbezieht, dass die beiden Transkriptionsfaktoren GaMYB2 (MYB, aus *Gossypium arboreum*) und GhHOX3 (HD-ZIP, aus *Gossypium hirsutum*) bei gemeinsamer Überexpression die Transkription des Zielgens *RDL1*(*RD22-like 1*) in Baumwolle regulieren, wobei die Proteinfunktionen gegen *GL1* und *GL2* austauschbar sind (Wang *et al.*, 2004). *GL2* könnte aber auch oder zusätzlich an *GL3* oder

TTG1 binden, da die transiente Transformation von GL3, GL2 und TTG1 eine sehr schwache TRY::GUS Expression in Kotyledonen ermöglichte. Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnten bisher nur eine schwache Interaktionen von GL2 mit TTG1 nachgewiesen werden (Wester, 2004).

Betrachtet man die Rettungseffizienz der TRY-Promotorfragmente Pr15, Pr23, Pr80 und Pr108 in Kombination mit dem Fragment-33 in Bezug auf die Nestfrequenz und die Verzweigung, so kommt man zu dem Resultat, dass die Funktion der drei Deletionsfragmente von Pr15 (Pr23, Pr80 und Pr108) für die Musterbildung identisch ist (s. Abb. 87): Sie können den Verzweigungs- und den Clusterphänotyp der *try* Mutante nicht retten, zeigen aber eine partielle Rettung des *cpc try* Clusterphänotyps. Damit ist der distale Bereich von Pr15 mit den beiden MYB-Bindungsstellen essentiell. Die Funktion der MYC-Elemente und der „GL2-Bindungsstelle“ ist folglich ohne die MYB-Bindungsstellen unerheblich für die Musterbildung der Trichome, denn das Fehlen der ersten und zweiten MYC-Bindungsstelle, sowie der GL2-Bindungsstelle verursachte in den Fragmenten Pr80 und Pr108 keine Änderung gegenüber Pr23. MYB- und MYC-Faktoren müssen also zusammen agieren, um Funktionalität zu vermitteln. Erstaunlich ist aber, dass die Fragmente Pr23, Pr80 und Pr108 eine zunehmende Reduktion der GUS-Expression in den Trichomen aufweisen, wodurch deutlich wird, dass die Expression, die durch den deletierten Bereich von Pr23 zu Pr108 vermittelt wird, keine Funktion für die Musterbildung widerspiegelt.

Wie die transiente Transformation der Kotyledonen gezeigt hat, kann die Expression von TRY auch durch einzelne Kombination der Gene GL1 und GL3, GL1 und TTG1 sowie GL2, GL3 und TTG1 (s.o.) initiiert werden. Diese Expression war aber sehr schwach und trat nur sehr selten auf. Dies entspricht der OR-Logik zur transkriptionellen Regulation, die besagt, dass auch einzeln bindende Faktoren eine Expression verursachen können, die aber nicht ausreicht, um das gesamte Expressionslevel eines Moduls zu liefern (Howard und Davidson, 2004). Die TRY-Expression, die durch Pr23 und dem proximalen Enhancer reguliert wird, konnte nicht durch die transiente Transformation mit den 35S-Konstrukten von GL1, GL3, TTG1 sowie mit GL2 aktiviert werden, da wahrscheinlich die Bindungsstelle für GL1 fehlt, die daher essentiell für die Aktivierung über den Aktivator-Komplex und GL2 zu sein scheint.

Dies bedeutet aber auch, dass alle Elemente die innerhalb der Deletionen von Pr23 zu Pr80 Pr108 lokalisiert sind und Bindungsstelle für die bHLH-Transkriptionsfaktoren und GL2 sein können, keine Funktion für die Musterbildung von Pr23 besitzen. Damit wird die partielle Musterbildungsfunktion von Pr23 nicht durch den Aktivator-Komplex vermittelt, sondern muss durch andere Faktoren reguliert werden.

Ein Überblick über die Interpretation der experimentellen Ergebnisse findet sich in dem Modell in Abb. 120.

3.3.5 *TTG2 als transkriptioneller Regulator des TRY-Gens*

In Pr23 findet man mit PLACE zwei W-Boxen (Bindungsstellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren), die durch nur 24 Nukleotide getrennt sind, und 20 Nukleotide später ein SP8-Element in dem proximalen Enhancer (s. Abb. 88). Das Protein TTG2 besitzt neben zwei WRKY-Domänen auch Homologie zu SPF1 aus Süßkartoffel, das an das SP8-Element bindet. Eine mehrfache Bindung von einem oder zwei TTG2-Molekülen wäre folglich über die zwei W-Boxen und das SP8-Element denkbar. Da die Funktionsverlust-Mutante *ttg2* Defekte in der Trichommorphogenese wie auch in der Musterbildung aufweist (Johnson *et al.*, 2002), könnte dieses Protein an der *TRY*-Regulation beteiligt sein. Die *try ttg2* Funktionsverlust-Doppelmutante zeigt einen intermediären Phänotyp in Bezug auf die Anzahl der Trichome (Ishida *et al.*, 2004). Die Analyse der Clusterfrequenz ist noch nicht veröffentlicht und könnte aber weitere Zusammenhänge offenbaren.

Bei der transienten Transformation der pTRY::GUS Pflanzen mit 35S::TTG2 und den Komponenten des Aktivorkomplexes konnte eine starke Zunahme der Expression in den Epidermiszellen der Kotyledonen festgestellt werden, so dass ein positiver Einfluss von TTG2 auf die *TRY*-Expression nachgewiesen wurde.

Für eine TTG2-vermittelte Regulation der *TRY*-Expression spricht auch, dass in der *ttg2* Funktionsverlust-Mutante keine *TRY*-Expression in den Trichomen nachgewiesen werden konnte. Dafür wurde aber Expression in den Blattprimordien und den Petiolen der Blätter detektiert. Der Verlust der vorderen W-Box von Pr23 in dem Fragment Pr81 führte zum selben *TRY*-Expressionsmuster. Außerdem vermittelte der Verlust beider W-Boxen in Linker-71 und in Fragment Pr73, in dem der Bereich der beiden W-Boxen von Pr23 deletiert wurde, keine Expression mehr.

Die veränderte Lokalisierung der *TRY*-Expression durch den Wegfall der proximalen W-Box in Pr81 oder durch den Wegfall des mutmaßlich bindenden Proteins TTG2 könnte auf die Bindung von anderen Faktoren an den Sequenzbereich zwischen den beiden W-Boxen hindeuten, der auf diese Weise zugänglich geworden ist. Hier konnten keine bekannten Bindungsstellen lokalisiert werden. Die distale W-Box ist aber auch Teil der Box1, die durch Motivsuche (MEME) mit dem 3'-Enhancer von *GL1* und dem minimalen *CPC*-Promotor gefunden wurde (s. Abb. 110), und deren Sequenz-Komplementarität zu einem Bereich des *LFY*-Promotors (Blazquez und Weigel, 2000) bereits beschrieben wurde (s. 3.2.7). Sie könnte folglich durch den Wegfall der Bindung des TTG2-Proteins in ektoptischen Geweben frei zugänglich geworden sein, wenn man annimmt, dass über TTG2 und/ oder damit interagierende Proteine (möglicherweise TRY) auch die Repression der *TRY*-Expression in anderen Geweben stattfindet. Die experimentelle Prüfung dieser These steht aber noch aus.

Der Verlust der proximalen W-Box führte zu einer Reduktion der Rettungseffizienz des Fragments Pr81 (eine MYC-Bindungsstelle, nur eine W-Box) gegenüber Pr80 (eine MYC-Bindungsstelle, beide W-Boxen). Beide W-Boxen alleine ohne MYC-Bindungsstelle vermitteln aber in Fragment Pr108 dieselbe Rettungseffizienz wie Pr23 (vgl. Abb. 87 und Abb. 120). Damit kommt der proximalen W-Box eine wichtige Bedeutung für die Musterbildung zu. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass beide W-Boxen, sowie möglicherweise das SP8-Element des proximalen Enhancers, der bei den Rettungsuntersuchungen jeweils fusioniert war, auch notwendig sind. Beide W-Boxen alleine ohne MYC-Bindungsstelle konnten im Gegensatz zur partiellen Rettung der Musterbildung keine GUS-Expression vermitteln (Pr108, s. Abb. 87), so dass auch hier die Diskrepanz zwischen GUS-Färbung und Funktionalität für die Musterbildung auftrat (vgl. Abschnitt 3.3.4). Für die Vermittlung der GUS-Expression kann folglich eine Interaktion von TTG2 mit bHLH-Transkriptionsfaktoren angenommen werden, die für das gesamte Expressionsprofil von *TRY* eine Rolle spielen kann.

Die Beobachtung, dass eine schwache *TRY*-Expression der Kotyledonen, die durch Pr23 und dem proximalen Enhancer, also ohne MYB-Bindungsstellen, reguliert wird, nur durch die gleichzeitige, transiente Transformation der 35S-Konstrukten von *GL1*, *GL3*, *TTG1* und *TTG2* ermöglicht wird, begründet die Annahme, dass für die Aktivierung durch TTG2 nicht alle Komponenten des Aktivator-Komplexes an die DNA gebunden sein müssen. Die TTG2-Bindung könnte demzufolge die in Abschnitt 3.3.4 beschriebene, Aktivator-Komplex unabhängige Expression von Pr23 vermitteln. Eine Zusammenfassung der TTG2-abhängigen *TRY*-Expression kann Abb. 120 entnommen werden.

Daraus resultiert die Frage, ob TTG2 allein, oder an den Aktivator-Komplex gebunden seine Funktion übernimmt? Um diese Frage zu beantworten, könnten pTRY::GUS Pflanzen mit 35S::TTG2 allein und in verschiedenen Kombinationen mit den Komponenten des Aktivator-Komplexes bombardiert werden, und zum anderen die Interaktion mit GL1, GL3 und TTG1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System getestet werden. Ob TTG2 mit GL2 interagieren, was aufgrund ähnlicher Phänotypen der Funktionsverlust-Mutanten (Johnson *et al.*, 2002) denkbar ist, kann auf dieselbe Art und Weise durch Kobombardement und Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen untersucht werden. Für eine von GL2 unabhängige Funktion des TTG2-Proteins spricht einerseits der intermediäre Phänotyp der *gl2 ttg2* Doppelmutante (Johnson *et al.*, 2002) und die unterschiedlichen pTRY::GUS Expressionsmuster in den Mutanten *ttg2* und *gl2*. Dabei zeigte sich, dass GL2 eher für die basale Blattexpression und TTG2 für die Expression in Trichomen verantwortlich ist. Zum anderen konnte eine starke Aktivierung der *TRY*-Expression in *gl2* Mutanten durch den Beschuss der 35S-Konstrukte der Komponenten des Aktivator-Komplexes in Kombination mit *GL2* oder mit *TTG2* erfolgen, so dass TTG2 unabhängig von GL2 verstärkende Funktion ausübt.

3.3.6 *TRY* inhibiert seine eigene Expression

Durch den Partikelbeschuss der 35S-Konstrukte von *GL1*, *GL2*, *GL3* und *TTG* konnte eine sehr starke, transiente Aktivierung der *TRY*-Expression in den Kotyledonen und den Blättern festgestellt werden. Die Addition von 35S::TRY führte zum Verlust der detektierbaren Expression. Die Überprüfung dieser Funktion für 35S::CPC bleibt noch zu testen.

Dieses Ergebnis rechtfertigt die These, dass die *TRY*-Expression durch TRY inhibiert wird. In einem kompetitiven Hefe-Drei-Hybrid-System konkurriert TRY mit GL1 um dieselbe Bindungsstelle zu GL3 (Esch *et al.*, 2003). Da der Aktivator-Komplex die *TRY*-Expression aktiviert, kann davon ausgegangen werden, dass TRY den Faktor GL1 (oder WER) aus dem Aktivator-Komplex verdrängt, der an die MYB-Bindungsstellen des distalen Bereiches von Pr15 binden, und mit den an die MYC-Elemente gebundenen bHLH-Faktoren GL3 (und EGL3), interagiert. Wenn man voraussetzt, dass TRY auf dieselbe Art und Weise wie das homologe Protein CPC wirkt, sollte TRY nicht an die MYB-Bindungsstellen binden, denn CPC kann im Gegensatz zu WER nicht an die MYB-Element des *CPC*-Promotors binden (Koshino-Kimura *et al.*, 2005).

Die schwächere GUS-Expression des *TRY*-Gesamtpromotors und des Minimalpromotors im Wildtyp gegenüber der starken ubiquitären Blatt- und Trichomexpression in der *cpc try* Mutante (s. Abschnitt 3.3.1 und Abb. 120) kann folglich auf die Störung der an verschiedene cis-Elemente gebundenen, interagierenden Proteine von GL1 und GL3/EGL3 durch TRY und/ oder CPC zurückzuführen sein.

Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass das Fragment Pr23 mit dem proximalen Enhancer nur in der *cpc try* Doppelmutante im Gegensatz zum Wildtyp die ubiquitäre Blatt- und frühe Trichomexpression lieferte (s. Abb. 78). Entsprechend den obigen Annahmen zu den bindenden Faktoren an den *TRY*-Promotor (s. Abschnitt 3.3.4 und Abb. 120) können die an Pr23 gebundenen bHLH-Faktoren (GL3/ EGL3) im Wildtyp vollständig durch die Interaktion mit TRY und/ oder CPC, die nicht an die DNA binden, in ihrer aktivierenden Funktion blockiert werden. Diese absolute Inhibition ist möglich, da GL1 durch den Verlust der Bindung an die MYB-Elemente außerhalb von Pr23 nicht mit den Inhibitoren um die Interaktion mit den bHLH-Proteinen konkurrieren kann. Erst die Entfernung der Inhibitoren würde GL3 eine Aktivierung ermöglichen. Diese Aktivierung ist aber schwächer als bei einer zusätzlichen Interaktion mit GL1, das an den *TRY*-Promotor über die MYB-Elemente gebunden ist, wie der Vergleich der GUS-Expression von Pr23 und Pr15 mit jeweils dem proximalen Enhancer demonstrierte. Die schwache kurzzeitige Trichomexpression von Pr23 im Wildtyp würde dann folglich nur durch TTG2 und/ oder GL2 vermittelt (s. Abschnitt 3.3.4 und 3.3.5), die durchaus trotz Inhibitoren noch mit GL3 interagieren könnten.

Die Aktivierung durch Pr23 reicht in der Epidermis der Primärwurzel im Gegensatz zu Pr15 aber nicht aus, um GUS-Expression zu vermitteln, womit die mutmaßliche Bindung von WER als MYB-Faktor an den *TRY*-Promotor und die Interaktion mit den anderen Faktoren, wie bHLH-Proteine, essentiell für diese Expressionsdomäne sein könnte.

3.3.7 Zusammenfassung der transkriptionellen Regulation von *TRY*

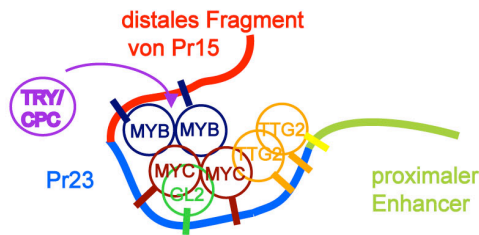
Zusammenfassend lässt sich also ein neues Modell (Abb. 120) der transkriptionellen Regulation von *TRY* im Rosettenblatt erstellen. Zum einen müssen für eine korrekte Expression zusätzlich zum Aktivator-Komplex aus GL1, GL3 und TTG1 auch die Transkriptionsfaktoren TTG2 und GL2 vorhanden sein. Dabei übernimmt TTG2 eher eine Rolle bei der Trichomexpression, während GL2 vorrangig für die basale Blattexpression notwendig ist. TTG2 interagiert wahrscheinlich mit den bHLH-Faktoren, während die Bindung von GL2 an den Aktivator-Komplex noch unklar ist, aber möglicherweise über GL1 oder TTG1 stattfindet. Es handelt sich aber hier um keine absolute Entscheidung, denn verschiedene Kombinationen dieser Faktoren liefern unterschiedliche, transkriptionelle Antworten, was der OR-Logik der transkriptionellen Regulation entspricht (Howard und Davidson, 2004). GL2 und TTG2 scheinen aber keine initiiierenden Rollen zu spielen, da sie eher die Aktivierung durch den Aktivator-Komplex verstärken. Mutagenesen der einzelnen, diskutierten cis-Elemente im Minimalpromotor (Pr15 mit proximalen Enhancer) könnte weiteren Aufschluss über den relativen Beitrag der bindenden Faktoren zur *TRY*-Expression liefern. Unklar ist bisher noch, wie die Rolle von TTG2 und GL2 für die Regulation der *TRY*-Expression mit der Trichom-Musterbildung in Einklang gebracht werden kann.

Für die Wurzelepidermis besitzt der Bereich, der die MYB-Elemente trägt entscheidende Bedeutung. Ob weitere Sequenzbereiche aus Pr23 auch vorhanden sein müssen, und welche Interaktionen hier wichtig sind, muss noch überprüft werden. Ungeklärt bleibt die vollständige Inhibition der Expression in der Wurzelepidermis des Wildtyps. Welche Faktoren bestimmen dies, wenn im Blatt dieselbe Interaktorik der Regulation zugrunde liegt? Beruht der Unterschied auf einer höheren Konzentration des Inhibitors CPC in der Wurzel- als in der Blattepidermis, die durch semiquantitative PCR nachgewiesen wurde (Schellmann *et al.*, 2002)?

Neben diesem Regulationsmechanismus gibt es aber auch Hinweise, dass eine GA-vermittelte Regulation erst den gesamten Umfang der Expression ermöglicht, und auch die Regulation durch lichtabhängige Faktoren und Kurztag-Variation kann nicht ausgeschlossen werden.

TRY-Minimalpromoter

Pr15 + proximaler Enhancer

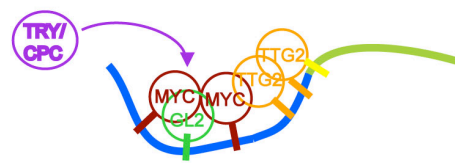


Expression in Trichomen
Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis
Rettung der Musterbildung
Rettung der Verzweigung

sehr starke Expression in Trichomen
sehr starke Expression in Blättern
Expression in der Wurzelepidermis

Deletionen

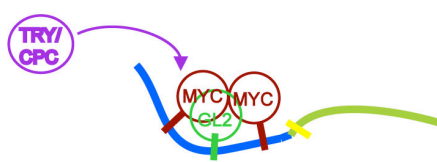
Pr23 + proximaler Enhancer



Expression in Trichomen (Phase 2/3-6)
keine Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis
partielle Rettung der Musterbildung
keine Rettung Verzweigung

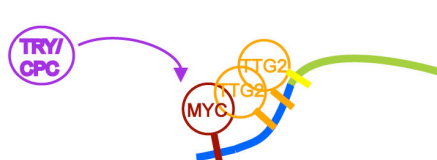
Expression in Trichomen (Phase 1-6)
Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis

Pr73 + proximaler Enhancer



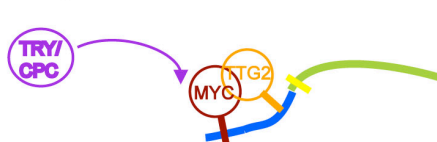
keine Expression in Trichomen
keine Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis

Pr80 + proximaler Enhancer



schwache Expression in Trichomen (Phase 2/3-6)
keine Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis
partielle Rettung der Musterbildung
keine Rettung der Verzweigung

Pr81 + proximaler Enhancer



keine Expression in Trichomen
Expression in jungen Blättern und Petiolen
keine Expression in Wurzelepidermis
sehr schwache Rettung der Musterbildung
keine Rettung Verzweigung

Pr108 + proximaler Enhancer



keine Expression in Trichomen
keine Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis
partielle Rettung der Musterbildung
keine Rettung der Verzweigung

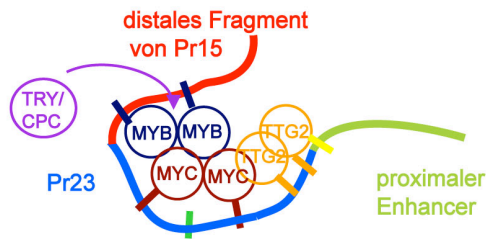
Linker-71 + proximaler Enhancer



keine Expression in Trichomen
keine Expression in Blättern
keine Expression in Wurzelepidermis

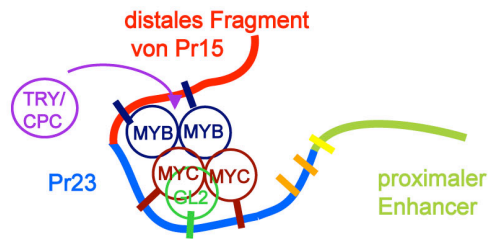
in *gl2* oder *ttg2* Mutante

gl2; Pr15 + proximaler Enhancer



Expression in jungen Trichomen

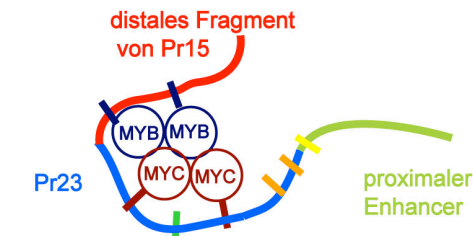
ttg2; Pr15 + proximaler Enhancer



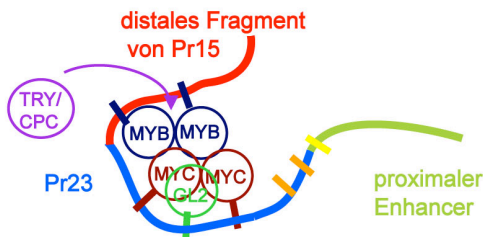
Expression in jungen Blättern
und Petiolen
keine Expression in Trichomen

Beschuss

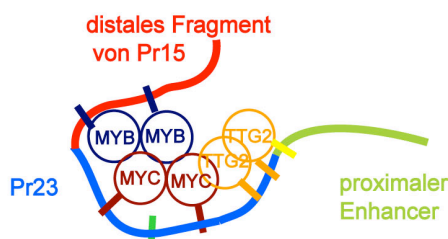
Pr15 + proximaler Enhancer



Beschuss *GL1*, *GL3*, *TTG1*:
mittel starke Aktivierung
in Kotyledonen und Blättern



Beschuss *GL1*, *GL3*, *TTG1*, *GL2*:
starke Aktivierung in Kotyledonen und Blättern
Beschuss *TRY*, *GL1*, *GL3*, *TTG1*, *GL2*:
keine Aktivierung in Kotyledonen und Blättern



Beschuss *GL1*, *GL3*, *TTG1*, *TTG2*:
starke Aktivierung in Kotyledonen

Pr23 + proximaler Enhancer



Beschuss *GL1*, *GL3*, *TTG1* und *GL2*:
keine Aktivierung in Kotyledonen



Beschuss *GL1*, *GL3*, *TTG1* und *TTG2*:
schwache Aktivierung in Kotyledonen

Abbildung 120: Zusammenfassung der Ergebnisse und Interpretation der TRY-Regulation

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Deletionsstudien, Untersuchung der Mutanten und der Partikelbeschüsse mit der Interpretation der interagierenden MYB (GL1/ WER)-, bHLH (GL3/ EGL3)-, HD-ZIP (GL2)- und WRKY (TTG2)-Transkriptionsfaktoren des *TRY*-Promotors. Die cis-Elemente sind in verschiedenen Farben gekennzeichnet: MYB, MYC, WRKY, SP8, GL2-HD-ZIP. In schwarz sind die Ergebnisse der GUS-Analysen im Wildtyp und in grau die der *cpc try* Doppelmutante beschrieben. In lila wurden die Ergebnisse der Rettungsanalysen aufgelistet.

3.3.8 Transkriptionelle Regulation von CPC im Rosettenblatt

Die nötige, regulatorische Information für die Expression von *CPC* konnte auf einen Bereich von 199 Nukleotiden in Pr17 eingeschränkt werden, der die vollständige GUS-Expression in den Rosettenblättern und der Primärwurzel aufwies. Eine Überprüfung der Rettungseffizienz dieses Fragments steht zurzeit noch aus. Da aber dieses kleine Fragment Pr17 die gleiche Rettung des Trichomphänotyps der *try* Mutante wie der Gesamtpromotor Pr24 zeigte, wenn unter dessen Kontrolle die *TRY*-cDNA exprimiert wird, kann vorerst von der korrekten Expression ausgegangen werden.

Die fortschreitende Deletionsserie von dem proximalen oder distalen Ende dieses Minimalfragments demonstrierte, dass es Unterschiede in der Regulation zwischen der Blatt- und der Wurzelexpression gibt. Zunächst sollen beiden Expressionsbereiche aber getrennt betrachtet werden.

Für das Blatt konnte gezeigt werden (vgl. Abb. 103), dass der Verlust des proximalen Bereichs von Pr17 zu Pr112 keine Auswirkung auf die Expression hatte, während eine weitere Deletion zu Pr111 zum Verlust der ubiquitären Blatt- und Schwächung der Trichomexpression führte. In dem deletierten Bereich von Pr112 zu Pr111 befinden sich keine komplexen Elemente. Es können nur die Elemente ARR1AT, CACTFTPPCA1, DOFCOREZM und GATABOX mit jeweils vier spezifischen Nukleotiden identifiziert werden. Das ARR1-Motiv bindet den Response-Faktor ARR1, der eine transkriptionelle Aktivierung vermittelt und im Zusammenhang mit Hormonregulation, wie Cytokinen, steht (Sakai *et al.*, 2000). Ebenso vermittelte die GATA-Box eine transkriptionelle Aktivierung und wurde im Zusammenhang mit Lichtregulation gefunden (Reyes *et al.*, 2004). Das CACT-Motiv ist für Mesophyll-Expression notwendig (Gowik *et al.*, 2004). DOF-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation vieler Gene beteiligt (Yanagisawa, 2002; Yanagisawa und Schmidt, 1999). Ob diese Elemente eine Funktion für die *CPC*-Expression besitzen, oder ob zurzeit noch unbekannte Elemente für die Verstärkung der Expression verantwortlich sind, muss durch Mutagenesen dieser cis-Elemente und Hefe-Ein-Hybrid-Untersuchungen geklärt werden. Eine weitere, proximale Deletion zu Pr110 führte zum vollständigen Verlust der Expression im Rosettenblatt, wofür ein hier identifiziertes MYB-Element und eine W-Box verantwortlich sein könnten. Die Mutagenese dieser beiden Elemente führte jeweils zu einer starken Reduktion der Trichomexpression und zum Verlust der ubiquitären

Blattexpression und war damit der Deletion von Pr112 zu Pr111 vergleichbar. Die möglichen, bindenden Faktoren sind ein MYB- und WRKY-Transkriptionsfaktor, sowie ein oder mehrere, unbekannte, verstärkende Faktoren in der proximalen 40 Nukleotidregion. Daraus folgt, dass das MYB-Element und die W-Box mit der noch unbekannten Bindungsstelle(n) im proximalen Bereich zusammen eine Interaktion über die jeweils bindenden Faktoren ermöglichen müssen, um die Blattexpression und sehr intensive Trichomexpression auch im adulten Trichom aufrecht zu erhalten. Dabei ist jedes Element mit seinen bindenden Faktoren essentiell (s. Abb. 121).

Eine distale Deletionsserie zeigte, dass der Bereich des Minimalpromotors noch weiter eingegrenzt werden kann. Erst der Verlust des oben erwähnten MYB-Elements und derselben W-Box führte in Pr115 zum Verlust der Expression. Eine Schwächung der Expression durch vorherige Deletionen war nicht festzustellen, und auch die Mutagenese des ersten MYB-Elements und der zweiten W-Box in diesem Bereich übte keinen Einfluss auf die Blattexpression aus. Damit kann die für die Blattexpression verantwortliche Promotorregion von *CPC* auf 80 Nukleotide zusammengefasst werden (s. Abb. 121). Dieser Bereich allein sollte zur Absicherung nochmal auf die vollständige GUS-Expression getestet werden.

Als bindender MYB-Transkriptionsfaktor kommt im Blatt GL1 in Frage. Die vorhandene MYB-Bindungsstelle ist aber als MYBCORE-Element nicht vom selben Typ wie in Pr15 des *TRY*-Gens, so dass durch EMSA-Untersuchungen (Electrophoretic mobility shift assays) geklärt werden muss, ob GL1 beide Promotoren an dem jeweiligen MYB-Element bindet. In Beschussexperimenten wurde die Aktivierung des *CPC*-Gesamtpromotors in den Kotyledonen durch die Kombination der Faktoren GL1, GL3, TTG1 und GL2 gezeigt, einzelne Kombinationen wurden bisher nicht getestet. Die W-Box könnte eine Bindungsstelle für TTG2 sein. Die Untersuchung der Aktivierung durch TTG2 steht in Zukunft an, sowie die Analyse des *CPC*-Expressionsmusters in den *ttg2* und *gl1* Funktionsverlust-Mutanten.

Offen bleiben einige Fragen: Wird für die *CPC*-Expression im Blatt kein MYC-Faktor benötigt und beschränkt sich die Regulation auf den MYB-Faktor als Komponente des Aktivatorkomplexes? Ist dieser MYB-Faktor GL1? Welche Faktoren binden in dem 40 Nukleotid-Fragment? Sind hier unbekannte MYC-Elemente lokalisiert? Spielt GL2 oder TTG2 eine Rolle? Kann TRY oder CPC die *CPC*-Expression inhibieren? Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Expression von *CPC* in den Funktionsverlust-Mutanten *ttg1*, *gl1*, *gl3*, *egl3*, *ttg2*, *gl2*, *try* oder *cpc*, sowie den zugehörigen, überexprimierenden Linien.

Interessanter Weise entspricht der Bereich, der die zwei MYB-Elemente und die wichtige W-Box für die Expression von *CPC* im Blatt beinhaltet, genau der Sequenz, die durch Motivvergleich von Pr17 mit dem *TRY*-Fragment Pr23 in dieser Arbeit gefunden wurde und auseinander ableitbar ist. Die MYB- und WRKY-Elemente sind aber in Pr23 an dieser Stelle nicht vorhanden, da ein bzw.

Der Austausch des *TRY*- gegen den *CPC*-Promotor zeigte, dass der *CPC*-Promotor und sein Minimalfragment Pr17 mit der *TRY*-cDNA die Funktion des *TRY*-Promotors sowohl für die Musterbildung als auch für die Verzweigung übernehmen konnte. Allerdings wurde die Verzweigungszahl überkompensiert, obwohl die *cpc* Mutante keinen Effekt auf die Verzweigung ausübt. Damit muss die Expression von *CPC* gegenüber *TRY* stärker oder zeitlich verändert sein. Kombiniert man den *CPC*-Promotor mit dem proximalen Enhancer von *TRY*, so fand eine Überkompensation des *try* Phänotyps statt, da weniger Trichome mit weniger Verzweigungen ausgebildet wurden. Dies spricht für eine vorhandene Interaktionsmöglichkeit dieser beiden Bereiche.

Wenn die beiden Gene durch Genduplikation entstanden sind, stellt sich die Frage, ob die Promotoren eine diversifizierende Evolution durchgemacht haben, die oft das Schicksal von duplizierten Genen bestimmt (Moore und Purugganan, 2005). Hat eine Subfunktionalisierung eines Vorläufergens stattgefunden, die die Funktionen von *TRY* und *CPC* etabliert hat? Der zu homologisierende Sequenzbereich des Motivvergleichs und die Tatsache, dass die beiden Promotoren ansonsten nicht in Deckung zu bringen sind, spricht für eine solche Evolution. Die homologe Sequenz könnte der gemeinsame Überrest einer starken Diversifizierung der beiden Promotoren sein. Die Gemeinsamkeit zur Realisation der Expression beschränkt sich damit vorläufig nur noch auf die Bindung von einem MYB- (wahrscheinlich GL1) und einem WRKY-Transkriptionsfaktor (wahrscheinlich TTG2), die aber an unterschiedliche Stellen der homologen Sequenzen binden. Die übrigen Faktoren, die die Expression bestimmen, unterscheiden sich wahrscheinlich. Damit wurde in jedem Promotor eine andere Strategie gewählt, um das jeweils vergleichbare Expressionsmuster zu ermöglichen, das sogar einen funktionalen Austausch der Promotoren erlaubt. Die Interaktion des proximalen Enhancers von *TRY* mit dem *CPC*-Promotor, die eine Überkompensation der *try* Mutante verursachte, spricht für eine erhaltene Kombinierbarkeit und enorme Komplexität verschiedener cis-Elemente der beiden Promotoren.

3.3.9 Transkriptionelle Regulation von *CPC* in der Wurzelepidermis

In der Wurzelepidermis übernimmt *CPC* die Hauptfunktion als Inhibitor der Musterbildung im Kontrast zur Trichom-Musterbildung (Wada *et al.*, 2002). Der verantwortliche, regulatorische Bereich konnte hier durch Deletionsstudien des Fragments Pr17 definiert werden.

Die erste proximale Deletion führte in Pr112 zu einer starken Expressionsreduktion und Aufhebung der Zellreihen-spezifischen Expression, während eine weitere Deletion zu Pr111 die völlige Elimination der Expression verursachte (s. Abb. 103). In dem vordersten Bereich können ein MYB-Element und ein TAAAG-Element, das für spaltöffnungsspezifische Expression entdeckt wurde, detektiert werden. Die noch unbekannten Faktoren für den deletierten Bereich von Pr112 zu Pr111, die für die Blattexpression eine Rolle zur Verstärkung spielen, könnten auch hier eine vergleichbare Funktion übernehmen. Der Verlust der ersten distalen Sequenz in Pr113 eliminiert die Expression in der Wurzelepidermis fast komplett bis auf wenige Zellen, die sich aber wahrscheinlich in einem Reihemuster befinden. Hier sind zwei W-Boxen lokalisiert, so dass sie möglicherweise für die Stärke der Expression, aber nicht für das Muster verantwortlich sind. Eine weitere, distale Deletion führt zum völligen Expressionsverlust, womit der Verlust eines SP8-Elements und der ersten MYB-Bindungsstelle, die auch eine MYC-Bindungsstelle darstellt, verbunden ist. Die Mutagenese der zweiten MYB- oder der dritten WRKY-Bindungsstelle im mittleren Teil von Pr17 (–538 bis –340) verursachte den vollständigen Verlust der epidermalen Expression in der Wurzel. Hingegen zeigte

die Mutagenese des ersten MYB- und des zweiten WRKY-Elements im distalen Teil keine Veränderung, wie beim Blatt.

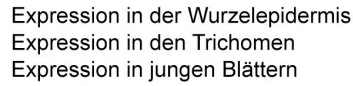
Aufgrund der eigenen Expressionsstudien kann auf die Interaktion von MYB- und WRKY-Transkriptionsfaktoren und der diskutierten, unbekannten Faktor(en) geschlossen werden. Die Regulation von *CPC* in der Wurzelepidermis unterscheidet sich in ihrer Komplexität deutlich von der im Blatt, da weitere Bindungsstellen gegenüber der Blattregulatorik hinzukommen müssen (vgl. Abb. 121 und 122).

Im Kontrast dazu stehen vor kurzem veröffentlichte Daten, in denen die Region von –492 bis –63 des *CPC*-Promotors benutzt wurde, jedoch nur die MYB-Elemente betrachtet wurden (Koshino-Kimura *et al.*, 2005). Eine dort analysierte, distale Deletionsserie des *CPC*-Promotors zeigte, dass die Elimination der ersten beiden W-Boxen keinen Effekt auf die Expression in der Wurzelepidermis und für die Trichome hervorruft, und dass erst die weitere Deletion des SP8-Elements, der ersten beiden MYB-Elemente und der dritten W-Box zum Verlust der Expression in der Wurzelepidermis und in den Trichomen führt. Die Mutagenese der MYB-Bindungsstellen führte zum Verlust der Wurzelexpression und der Trichomexpression. Diese Diskrepanzen zu den eigenen Daten könnten auf den unterschiedlichen, benutzten Promotorfragmenten (–538 bis –340 versus –492 bis –63) oder die Grundgerüst-Vektoren (PARB versus pBI101) beruhen. So könnten z.B. gerade die ersten beiden W-Boxen in Pr17, die genau in der Region vor –492 lokalisiert sind, eine Verstärkung in Pr17 ermöglichen. Daraus wird ersichtlich, dass die regulatorischen Interaktionen von Pr17 sich von denen der distalen Deletion des Gesamtpromotors unterscheiden. Interessant ist aber, dass eine achtfache Tandem-Wiederholung des 69-Nukleotid Bereichs mit den beiden vorderen MYB-Elementen und der letzten W-Box die Expression in Trichomen und Nicht-Wurzelhaarreihen ermöglicht (Koshino-Kimura *et al.*, 2005). Damit sind der proximale Bereich und die distalen W-Boxen von Pr17 offenbar bei einer Vervielfachung des veröffentlichten 69-Nukleotid Bereichs unwichtig, und eine Wiederholung von MYB-Elementen und W-Boxen ist ausreichend, um die *CPC*-Expression zu steuern.

Es stellt sich die Frage, welche übergeordneten Faktoren die Expression von *CPC* regulieren könnten. Expressionsstudien von pCPC::GUS in den entsprechenden Musterbildungsmutanten ergaben den MYB-Transkriptionsfaktor WER und das WD40-Protein TTG1 als positive Regulatoren der *CPC*-Expression in der Wurzelepidermis (Lee und Schiefelbein, 2002; Wada *et al.*, 2002). In Bindungsstudien wurde gezeigt, dass WER mit den MYB-Bindungsstellen interagiert, und zwar wesentlich besser mit der zweiten als mit der ersten MYB-Bindungsstelle (Koshino-Kimura *et al.*, 2005). Damit kann die Regulation über WER vorausgesetzt werden. WER interagiert voraussichtlich mit einem MYC-Transkriptionsfaktor, wie die Interaktion von WER mit dem R-Gen im Hefe-Zwei-Hybrid-System vermuten lässt (Lee und Schiefelbein, 1999). Die

Überexpression des bHLH-Gens *R* aus Mais führt zu einer uniformen *CPC*-Expression in allen epidermalen Zellreihen der Primärwurzel, da alle Zellen das Nicht-Wurzelhaar-Schicksal annehmen (Wada *et al.*, 2002). In der *gl3* Mutante ist die *CPC*-Expression reduziert, in der *egl3* Mutante unverändert und in der *gl3 egl3* Doppelmutante völlig eliminiert (Bernhardt *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse sprechen für eine bHLH-gesteuerte Regulation der *CPC*-Expression. Es konnte jedoch nur eine MYC-Bindungsstelle in Pr17 bestimmt werden, die gleichzeitig das erste MYB-Element beschreibt und durch die schwächere Bindung von WER (Koshino-Kimura *et al.*, 2005) beschrieben wurde. Weitere, noch unbekannte MYC-Bindungsstellen könnten wie auch für die Blattexpression in dem vorderen Bereich lokalisiert sein. Denkbar ist aber auch, dass ein bHLH-Faktor für die *CPC*-Regulation gar nicht an die DNA binden muss, sondern nur durch Protein-Protein-Interaktion über WER die *CPC*-Expression reguliert. Das Protein *CPC* inhibiert seine eigene Expression und interagiert mit dem *R*-Gen, sowie mit *GL3* und *EGL3* (Bernhardt *et al.*, 2003; Kirik *et al.*, 2004b; Lee und Schiefelbein, 2002; Wada *et al.*, 2002), ist aber nicht in der Lage, WER von seiner DNA-Bindungsstelle zu verdrängen (Koshino-Kimura *et al.*, 2005). Damit fungiert *CPC* vermutlich als Inhibitor, indem es mit WER um die Bindung zu den bHLH-Faktoren konkurriert. Als mutmaßlicher WRKY-Transkriptionsfaktor, der an die W-Boxen binden könnte, ist das Protein *TTG2* denkbar. Die *ttg2* Funktionsverlust-Mutante zeigt zwar keinen Defekt in der Wurzelepidermis, aber *TTG2* wird dort exprimiert (Johnson *et al.*, 2002), so dass die Funktion für die *CPC*-Regulation zu überprüfen bleibt. Im Gegensatz zur *TRY*-Expression scheint *GL2* keine Funktion für die Regulation der *CPC*-Expression zu besitzen, denn die *CPC*-Expression in der Wurzel der *gl2* Mutante ist unverändert (Lee und Schiefelbein, 2002; Wada *et al.*, 2002), und eine Bindungsstelle für *GL2* konnte in Pr17 nicht identifiziert werden. Ein mögliches Modell für die Regulation der Wurzelexpression findet sich in Kombination mit den experimentellen Ergebnissen in Abb. 122.

Eine interessante Beobachtung ist, dass der *GL2*-Promotor zusammen mit der *CPC*-cDNA die *cpc* Mutante vollständig retten kann (Wada *et al.*, 2002). Ein Vergleich dieser beiden Promotoren könnte weitere Aufschlüsse über die Regulation geben. Die Promotor-Deletionsanalysen von *GL2* ergaben zwei MYB-Bindungsstellen, die essentiell für die Expression sind (Szymanski *et al.*, 1998a) und an die die Bindung von WER nachgewiesen werden konnte (Koshino-Kimura *et al.*, 2005). In ihrer Umgebung befindet sich keine MYC-Bindungsstelle, aber eine WRKY-Bindungsstelle, wie eigene *in Silico* Untersuchungen zeigten (Daten nicht gezeigt). D.h. das *CPC*-Gen und das *GL2*-Gen könnten vermutlich eher als koregulierte Gene angesehen werden, so dass ihr Vergleich weitere Aufschlüsse über die transkriptionelle Regulation geben könnte.



Mutationen

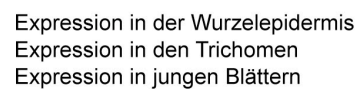
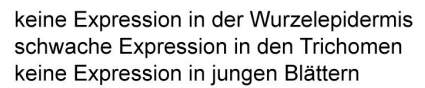
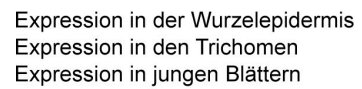
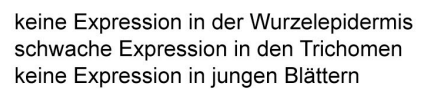
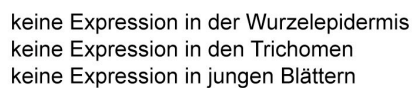
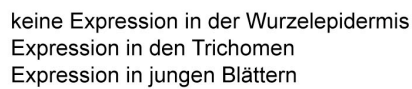
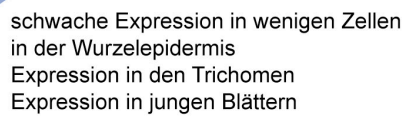
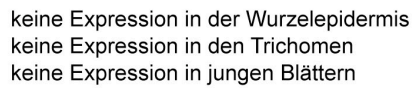
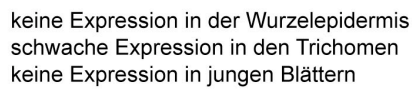
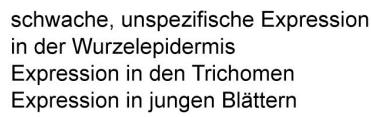


Abbildung 122: Zusammenfassung der Ergebnisse und Interpretation der CPC-Regulation

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Deletionsstudien, Untersuchung der Mutanten und der Partikelbeschüsse mit der Interpretation der interagierenden MYB (GL1/ WER)-, bHLH (GL3/ EGL3)-, HD-ZIP (GL2)- und WRKY (TTG2) –Transkriptionsfaktoren des *CPC*-Promotors. Die Elemente sind in verschiedenen Farben gekennzeichnet: MYB, MYC, WRKY, SP8.

3.4 Aktivatoren und Inhibitoren unterliegen transkriptioneller Regulation von sehr unterschiedlicher Komplexität

Die Gene *GL1* und *WER* kodieren für homologe Proteine, die im phylogenetischen Stammbaum der MYB-Gene in einem Ast lokalisieren. Die MYB-Domänen dieser Proteine sind zu 91% identisch. Es kann aber nur wenig Ähnlichkeit außerhalb dieser Bereiche gefunden werden (Lee und Schiefelbein, 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass ein gemeinsames Vorfahren bereits vor längerer Zeit dupliziert wurde. Die unterschiedlichen, entwicklungsbiologischen Funktionen der beiden Gene können theoretisch sowohl auf Variationen in den Proteinen oder auf Veränderungen der cis-regulatorischen Sequenzen basieren. Wie Proteinaustausch-Experimente zeigten, sind die Proteine funktional austauschbar (Lee und Schiefelbein, 2001), damit können die Sequenzunterschiede der Proteine nicht die Ursache für ihre divergente Funktion sein. Die Entwicklung dieser duplizierten Gene könnten nach dem DDC-Modell (Duplikation-Degeneration-Komplementationsmodell) auf der Verteilung der Funktionen des Vorfahrens auf die beiden Gene zurückzuführen sein (Force *et al.*, 1999), so dass *GL1* die Spross-Spezifikationen und *WER* die Wurzel- und Hypokotyl-Spezifikationen erhalten hat. Die Etablierung einer neuen Expressionsdomäne für *WER* in der Wurzel wäre natürlich auch denkbar, da sich die spezielle Anordnung der Wurzelhaare in alternierenden Reihen erst innerhalb der Cappareles, zu der die Familie Brassicaceae und damit *Arabidopsis* gehören, entwickelt hat (Dolan, 2001b; Dolan und Costa, 2001). Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass beide Gene ein hochkomplexes System zur Regulation der Expression besitzen, das aus vielen, einzelnen Domänen besteht, denen möglicherweise unterschiedliche, entwicklungsbiologische Funktionen in der Verarbeitung von übergeordneten Signalen zukommen. Liegt die wichtigste Information für das *GL1*-Gen im 3'-Enhancer, so scheint der wichtigste Bereich für *WER* im proximalen 5'-Bereich zu lokalisieren. Auch wenn keine homologisierbaren Promotorsequenzen gefunden werden konnten, so zeigte der Blick auf das Vorkommen von diversen, cis-regulatorischen Elementen, dass viele der Elemente der beiden Gene übereinstimmend sind, aber auch spezielle Elemente existieren. In Zukunft muss folglich die Funktionalität der einzelnen Elemente und ihre bindenden Faktoren identifiziert werden, um das komplexe, regulatorische Netzwerk der beiden Gene entschlüsseln zu können, und ihre Verbindung zu den übergeordneten Signalen zu beleuchten. Erst dann wird die Zuordnung cis-regulatorischer Elemente zu divergenten und gemeinsamen Funktionen, die die beiden Gene erfüllen

müssen, möglich sein. Schaut man sich die Regulation orthologer Gene zu den MYB-Faktoren *GL1* und *WER* an, die am Anfang eines vergleichbaren Initiationsprozesses stehen, so konnte z.B. für das *CI*-Gen und das *P*-Gen der Phlobaphen-Synthese aus Mais ebenfalls eine hochkomplexe Regulation beschrieben werden. Für das *CI*-Gen wurde z.B. die Interaktion über die cis-Elemente für ABA, VP1 und Lichtaktivierung untersucht, während für *PI* über einen sehr großen 5'-Bereich unterschiedliche Expressionsdomänen verantwortlich gemacht werden konnten (Cocciolone *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 1996; Scheffler *et al.*, 1994; Sidorenko *et al.*, 1999; Sidorenko *et al.*, 2000). Eine derartige Komplexität der Regulation ist auch einleuchtend, da viele unterschiedliche organ-, gewebe-, zellspezifische, entwicklungsbiologische und umweltabhängige Signale verarbeitet werden müssen, um das jeweilige System, hier die Trichom- bzw. Wurzelhaar-Musterbildung, darauf abzustimmen und flexibel zu halten.

Daraus resultiert natürlich die Frage, ob diese Komplexität auch auf die Regulation der Inhibitoren zutrifft. Die eigenen Promotoruntersuchungen des *TRY* und des *CPC*-Gens können dies sehr klar verneinen. Allein die Tatsache, dass die verantwortlichen, regulatorischen Regionen auf sehr kurze Sequenzen (600 bzw. 200 Nukleotide) eingeschränkt werden können, spricht schon dagegen. Die Zusammensetzung der mutmaßlichen, regulatorischen Faktoren kann auf wenige limitiert werden. Dies spricht für die Regulation durch nur ein zeitlich-räumliches, regulatorisches Modul, da die Transkriptionsfaktoren eines Moduls meist 4-8 bindende Faktoren aufweisen (Davidson, 2001). Die Inhibitoren stehen innerhalb der regulatorischen Hierarchie der Musterbildung in Abhängigkeit zum Aktivator-Komplex. Die Flexibilität des Systems Musterbildung wird also auf der höchsten Ebene determiniert, während die folgende, inhibitorische Ebene eine einfache, lineare, störunanfällige Regulation ermöglicht. Nichts desto trotz, kann aber zumindest für *GL1* und *TRY* angenommen werden, dass sie beide über GA reguliert werden, um Aktivator und Inhibitor auf dem Grundlevel gleichzeitig bereitzustellen.

Eine Trichom- oder Nicht-Wurzelhaarspezifische, regulatorische Promotorbox der Aktivator- und der Inhibitor-Gene gibt es folglich nicht, da die beiden cis-regulatorischen Systeme völlig unterschiedlich gestaltet sind. Die wichtigste, regulatorische Domäne von *GL1*, der 3'-Enhancer, kann aber die Expression der *TRY*-cDNA zur Rettung des Musterbildungsdefektes der *try* Mutante steuern, obwohl keine vergleichbaren Elemente oder Transkriptionsfaktor-Zusammensetzung angenommen werden können. Die Kombination des 3'-Enhancers von *GL1* mit dem proximalen Enhancer von *TRY* führte allerdings zu einer schlechteren Rettung, was für eine Konkurrenz dieser regulatorischen Systeme spricht. Hingegen kann der *TRY*-Promotor die *gll* Mutante mit der *GL1* cDNA nicht retten, und der *CPC*-Promotor kann nur vereinzelt Trichome initiieren. Eine unterschiedliche Kombinatorik der bindenden Faktoren kann folglich trotzdem das gleiche funktionale Expressionsmuster liefern, wobei allerdings das Expressionsmuster der übergeordneten

Aktivatoren das der untergeordneten Inhibitoren zu umfassen scheint, da die Austauschbarkeit nur in einer Richtung vorzufinden ist. Zu beachten ist aber, dass die Expressionsdomäne von *TRY* für die Trichomverzweigung durch *GL1* nicht übernommen werden konnte. Da *GL1* für die Regulation der Verzweigung keine Rolle spielt, ist dies nachzuvollziehen. Unverständlich bleibt aber, dass gerade der 3'-Enhancer eine sehr starke und lang anhaltende GUS-Expression lieferte, die aber nicht ausreichte, die korrekte *TRY*-Expression für die Regulation der Verzweigung zu liefern.

Auch der Vergleich der beiden, auf Proteinebene sehr ähnlichen Inhibitoren *TRY* und *CPC* (Schellmann *et al.*, 2002) liefert keine Hinweise auf die Frage einer spezifischen Promotorbox, die die „spezifische“ Sequenz für das Trichom oder das Nicht-Wurzelhaar besitzt. Wenige der notwendigen cis-Elemente können zwar in beiden Minimalpromotorregionen gefunden werden, aber diese sind nicht einmal in der Nukleotid-Zusammensetzung identisch. Umso erstaunlicher waren die eigenen Ergebnisse des Austauschs der regulatorischen Bereiche von *TRY* und *CPC*, die für die ubiquitäre Blatt- und Trichomexpression verantwortlich sind. Der *CPC*-Promotor konnte bei der Rettung gegen den *TRY*-Promotor funktional vollständig ausgetauscht werden, und der *CPC*-Promotor war sogar fähig den Trichomverzweigungsdefekt der *try* Mutante zu retten, obwohl in diesem Entwicklungsprozess für *CPC* keine Funktion nachzuweisen ist (Schellmann *et al.*, 2002). Es lässt sich folglich vermuten, dass eine teilweise ähnliche Kombination von Faktoren eine ähnliche Expression liefert. Die Expressionsdomäne von *CPC* scheint allerdings gegenüber der von *TRY* in der Stärke der Expression und/ oder räumlich und/ oder zeitlich tendenziell verschoben zu sein, da eine schwache Überkompensation festzustellen war, was auch dadurch bestätigt wird, dass der *CPC*-Promotor im Gegensatz zum *TRY*-Promotor in der *gli* Mutante mit der *GL1*-cDNA Trichome initiieren konnte. Diese ähnliche Funktionalität der beiden Promotoren, die jedoch auf cis-Element-Ebene wenig ähnlich sind, spricht für eine frühe divergierende Entwicklung der wahrscheinlich duplizierten Gene *TRY* und *CPC*, die sich vielleicht funktional nie weit voneinander entfernten, aber trotzdem Subfunktionen annahmen, wie der starke Phänotyp der *cpc try* Doppelmutante gegenüber den Einzelmутanten eindrucksvoll demonstriert. Damit werden *TRY* und *CPC* im Rosettenblatt zwar auf den ersten Blick koexprimiert, aber nicht vollständig koreguliert.

Der Vergleich von orthologen Promotoren in anderen Arten oder Gattungen könnte weitere Informationen liefern (Phylogenetic Shadowing und Phylogenetic Footprinting), da zwischen verschiedenen Spezies wahrscheinlich eine vergleichbare Regulation bei identischer Funktion eines Gens in der Evolution erhalten wurde, wie z.B. für die Regulation des Gens *AGAMOUS* gezeigt wurde (Hong *et al.*, 2003).

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Materialien

4.1.1 *Chemikalien und Antibiotika*

Alle allgemein verwendeten Chemikalien und Antibiotika wurden in analytischer Qualität von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München, Steinheim), VWR (Darmstadt), Duchefa (Haarlem) und Difco (Hamburg) bezogen.

4.1.2 *Enzyme*

Die angewendeten Enzyme wurden von den Firmen MBI-Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt/ Main) und Roche (Mannheim) bezogen.

4.1.3 *Molekularbiologische Kits*

Zur Plasmidisolation wurden der Säulen-pEQ-LAB Plasmid Miniprep KitI (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen), sowie die von Quiagen vertriebenen Mini-, Midi- und Maxiprep Kits verwendet. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Quiaex- und Quiaquick-Kits, sowie MinElute-Kits (Quiagen) genutzt. Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des High Pure PCR Purification Kits (Roche, Mannheim).

Für die Amplifikation von cDNA-Enden wurde das 5'/3'- RACE-Kit (Roche, Mannheim) benutzt.

Für die Hybridisierung und Detektion im Southern Blotting wurde das DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) verwendet.

4.1.4 *Verwendete Oligonukleotide*

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Invitrogen und Metabion bestellt. Die Sequenzen befinden sich in der Tab. 20.

Tabelle 20: Verwendete Oligonukleotide

5'-GL1	
GL1-F1-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGTAGTTTTTTTATAACCGAAATACTATTAGCTAGTGG
GL1-F1-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTATAAGAGACCAAAATTAATCTCCTC
GL1-F2-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCTACCCGAAAAATTAGAGG
GL1-F2-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTATATTGTATGATTTAACTG
GL1-F3-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAAAATAATATGTAGTTCCAATG
GL1-F3-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTACATCAATACGTATCTTTG
GL1-F4-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAATCTGCCCATATTTAGTAG
GL1-F6-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGATTCCTTCTATGTTGTGTGTGTC
GL1-F0-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATTCTTAGAAATAATTGTTGTACTTTCTCGAG
GL1-Kombi-10+2-for	GGTCTCTTATTAACTGCCCCCATATTAG
GL1-Kombi-7+2-for	GGTCTCTTATAAAATAATATGTAGTTCCAATG
GL1-Kombi-2+10rev	GGGGCAGATTAAATAAGAGACCAAAATTAATCTCCTC
GL1-Kombi-2+7-rev	CATATTATTTTAAAGAGACCAAAATTAATCTCCTC
Primer94-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTATGTCTCACAACATATTTAAC
Primer95-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGACAAAGTGAAGAGCAGAGC
Primer96-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGTTAAATTTATTACTC
Primer97-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTACTGTTAATATACAAAGAC
Primer98-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTTGAGTAAATAAATTAACCC
Primer99-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATGTCTTTGTATATTAACAG
5'-GL1-größer-Col-for	CTATGCCAATCATATATGTTTGTGTGGC
5'-GL1-größer-Col-rev	AGAACATAGTCCATAAGGATGTTGTCTTC
3'-GL1	
GL1-F5-sen-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTTGTGTGATATCTTCCGCG
GL1-F5-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGTGTGATACCACTTTTCATC
3'-GL1 for SpeI	NACTAGTACGTTGTGTGATATCTTCC
3'-GL1 rev SpeI	NACTAGTATTATGTGTATACCACTTTCATC
MP-3'-GL-BglII-for	NAGATCTACGTTGTGTGATATCTTCC
MP-3'-GL-BglII-frev	NAGATCTATTATGTGTATACCACTTTCATC
3'-GL1-In1-for-N-SpeI	NACTAGTATAGGGACATACATATGCG
3'-GL1-In1-rev-SpeI	NACTAGTAATAAATAGACGTGTCAAACG
3'-GL1-In2-for-SpeI	NACTAGTCAGTAGTAATCTTTGCCGGG
3'-GL1-In2-rev-SpeI	NACTAGTCGGCAAAGATTACTAGTT
Primer65-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTACGCATATGTATGTCCTATGTG
Primer66-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGTCTATTTATTATTAACCACTG
Primer67-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTAAAGATTACTACTGTTTGAAGAAC
Primer68-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTAGAAACACTAATTAGAACATCAAAATTG

28-del-5'-40-attB1	GGGGACAAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTACACTATAAATTTGGTCATTAATTAC
30-del-3'-ab-143-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAGAAAAACATGTGGTTTAATTTCAAC
30-del-3'-ab-99-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACTTTGCGTGTCCCTTCTGATG
32-del-3'-ab-181-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTCATCTTAAATAATTTACGTTTC
3'-GL1-InI1-rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAATAATAGACGTGTCAAACG
3'-GL1-InI1-forN-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATAGGGACATACATATGCG
3'-GL1-InI1-for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAGTAGTAATCTTTGCCGGG
MP-30-del-5'-ATHB1-MYC-MYB-for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCAATAATTGAGTTGAAATTAAC
MP-30-del-5'-rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCGCAAGATTACTAC
PCR-Linker-67-for-Spel	CTAGTTACATATGCGTACGGGTCTGTACACGCTCTATTATTATTT
MP-PCR-Linker-67-rev-Spel-na	CTAGAAATAATAAATAGACGTGTCAACGACCCGTACGCATATGTAA
PCR-Linker-68-for-Spel	CTAGTTGCCGGGAATTTTCGACACCAAAAACATAAGATTTAACAAAAT
MP-PCR-Linker-68-rev-Spel-na	CTAGATTTTGTTAAACTCATAGTTTGGTGTCTGAAATTCGCCGCAA
GL1-Intron1	
GL1-Intron1-Ler-for-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTACTCTTCTCTCTCTCGTTTG
GL1-Intron1-rev-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATCAACGAATCAAAATTAG
5'-RACE-GL1	
5'-GL1-RACE-rev-3	CGATGCGGTTCATTGGCCAG
5'-GL1-Race-rev-2	ATTGCCTTTGTTCACATFAGGGCTC
5'-GL1-RACE-rev-1	TTGCCATTAGGACATCTTTTGTAG
5'-GL1-RACE-rev-4 #126	CTAAAGGCAGTACTCAACATCACC
5'-GL1-Race-rev-5 #126	GGCAGTGATGAACAATGACGGTGG
anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGAC
oligo(DG)anchor	GACCACGCGTATCGATGTCGACGGGGGGGGGGGGN
5'-WER	
WER-F1-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAATATATCAATTAGTTCGTAGC
WER-F1-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTTATAATCACGTATATTG
WER-F2-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTTCAAAACAAAGTTAATATTTGCTTACAACACAGATTGG
WER-F2-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAATATAAAGGAGGTTGTG
WER-F3-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTCATAAATAAAGTATCTAAAC
WER-F3-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATATACTATTGGTATAAATAC
MP-WER-F5-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCAATAATCAATAGTAATAG
MP-WER-F5-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATTGTCTCAACTAACC
MP-WER-F6-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCATCATGTAGTAGACAC
MP-WER-F6-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAATAGTGTGTTATTTTCATC
MP-WER-F7-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTTTATTAATAATATTATCATAC
MP-WER-F7-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTTGTGTTCTTGTGAATG
MP-WER-F8-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTAGTTGAGAAAAACAATAC

MP-WER-F9-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGAACTATGAGAGCCAG
MP-WER-F10-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACAACCTCCTTTATATTG
3'-WER	
WER-F4-sen-Apal	NNGGGCCCGTGTCTTCTGCTTTTGTATTATTAG
WER-F4-asen-Apal	NNGGGCCCTTTGCTGAAGTTGCTTTGA
5'-TRY	
TRY-F1-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAAGAGATATTTACCAACTAGGC
TRY-F1-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTATGGGAATAATATTATATC
TRY-F2-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAAAGAAAAAGTCAATCGGGAATGAG
TRY-F2-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTTTTTTTTCAGGGTTGGAC
TRY-F3-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGAAACTAAATTTGTTACTATATGG
TRY-F3-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAAGAAAGTGTGTGTGGTCT
TRY-F4-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTAAACATCGTTGAACTTG
5'-TRY-179-HindIII-for	CAAGCTTACTATTAGTTTGTGCAAGGCCGT
5'-TRY-179-HindIII-rev	CAAGCTTTATTGAAGTAAGAAAAAGAAAAAATAGAGAG
PCR-Linker-71-for-Spel	CTAGTGTGTAATTTGAGTGTCAACGACAAAGTCTACACAAAAGT
MP-PCR-Linker-71-rev-Spel-na	CTAGACTTTGTGTAGACTTGTGCTTGACACTCAAATACACA
5'-TRY-F4-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTCAAATACACATGGAGATG
Primer91-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAATCCCAATAAAAGAC
Primer92-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGTGACCTTTACCC
Primer93-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTCTTTGTGTAGACTTG
Primer-72-for-mit-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTGTAATTTGAGTGTCAACGACAAATC
5'CPC	
CPC-F1-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGAACACATATAAGGGACATACTGG
CPC-F1-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGTGTGTGTGTGTGTG
CPC-F2-sen-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATCGAATTCCTGAACTTATATCACAGTCC
CPC-F2-asen-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGGCTCGAAAGGAAAAAGAAATCAAAC
PCR-Linker-77-for-Spel	CTAGTTCTCCAACCTGTCTGAACGAGGAATTTTACAACCCGAAGTCAAAAGT
PCR-Linker-77-rev-Spel-na	CTAGACTTTGACTTGGCGTTGTAAAAATTCCTCGTTTACAGACAGTTGGAGAA
17-del-3'-ab-41-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTGACTTTTCGAAATGACCAATATGTC
17-del-3'-ab-121-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTAAATCCTTTGACTTGGCGTTG
17-del-3'-ab-161-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTATAGAGAAAGAACACAGATAC
17-del-3'-ab-81-attB2	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTACAGACAGTTGGAGAAATAGTAGC
17-del-5'-120-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAAGTAGTTATGGTTGTATCTGTCG
17-del-5'-160-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAACCTAAAGGCCGTTGGAAGCAAC
17-del-5'-40-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAAGCCAGAGGAAAGTACTATTTC
17-del-5'-80-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAACGAGGAATTTTACAACCGCAAG
Pr17-mutidentTRY-Fr1-rev	CTTATTTAAATCCCTTCCCGGGCGGTTGTAAAAATTC

Pr17-mutidentTRY-Fr2-for	GAATTTTACAAACCGCCCGGAAAGGATTTAAAAATAAG
Pr17-mutBox1-Fr2-for	GAAGTACTATTCTCCAACGTGTCCTCCAGGGCCGG
Pr17-mutBox1-Fr1-rev	CCGGCCCTGGGACAGTTGGAGAAATAGTAGCTTC
Pr17-mutMYB1-Fr1-rev	CCTCGTTACAGACCCGGGGAGAAATAGTAGCTTC
Pr17-mutMYB1-Fr2-for	GAAGCTACTATTCTCCCGGGTCTGTAAACGAGG
Pr17-mutMYB2-Fr1-rev	CTTATTTAAATCCTTTGACTTGGGGCCCTAAAAATTC
Pr17-mutMYB2-Fr2-for	GAATTTTAGGGCCCCAAGTCAAAGGATTTAAAAATAAG
Pr17-mutW-Box1-Fr1-rev	CTCCTCTGGCTCCGGGTTTCGAAATGACCAAGTATG
Pr17-mutW-BOX1-Fr2-for	CATACTGGTCAATTCGAAACCCGGAGCCAGAGGAG
cDNA ohne Stopp	
CPC-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTTTCGTTCAACAAGGCGG
GL1-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGAATAAGGAGAAAGATGAAAAAGAGAATC
GL2-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGTCAATGGCCGTCGACATGT
GL3-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCTACCGGACAAAAACAGAACAA
TRY-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGATAACACTGACCCGTCGTCTG
TTG-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGATAATTCAGCTCCAGATTTCGT
WER-Stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGAAAGAAAGTAAAGTAGTAGTG
CPC-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTTTTCCTAAAAAAGTCTCTTCGTCTG
GL1-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAAGGCAGTACTCAATATCACTAGA
GL2-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGCAATCTTCGATTGTAGACTTCTC
GL3-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTACAGATCCATGCAACCCCTTTGAAAG
TRY-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTGGAAGGATAGATAGAAAAAGCGAG
TTG-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAACTCTAAGGAGCTGCATTTTGTGA
WER-Stop-attB2T-N	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAAAAACAGTGTCCATCTATAAAGTC
T1-stop-attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGAGAATGACAAGAGATGGAAGAAAGAAC
T1-stop-attB2T	GGGGACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGTTAAGGCAATACCCATTAGTAAAAATCCA
Sequenzierung	
MP-Seq-PARB-cDNA	TCAAGCTTATCGATACCGTCGAC
MP-Seq-PARB-GUS-rev	CACAGTTTTCGGGATCCAGACTGAATGC
pDONR201 seq-attL1	TCGGGTTAACGCTAGCATGGATCTC
pDONR201 seq-attL2	GTAAACATCAGAGATTTTGAGACAC
Seq-Basta cDNA	CCACTGACGTTCCATAAAATCCCCCTCGG
GL1-rev	CTAAAGGCGAGTCAATATCACTAGAAAGC
WER-rev	TCAAAAAACAGTGTCCATCTATAAAAGTCCATCATGTGT
GL2 seq int N1>	GATGATCTCCACCTCGAAAACTCC
GL2 seq int N2>	GGCAATAGTGGACGCTCTCGGTCTCC
GL2 seq int N3>	CGCCATTGCTGCATCAAGCTACCA
GL3 seq int N1>	TGCGTGAAGACATCATCTCCTCGAA
GL3 seq int N2>	CTTCTCTTCTGGTGCACCTCG

TTG seq int NI>	TCGCTTCCTCCGGCGATTTC
GL2 seq int NO	AGCAAAAGACAGAGCTGAGCAAGC
MP-pAMPAT-cDNA for	CGAGAAAGAGGATCCACCTGAGGATCAC
MP-pAMPAT-Promot-rev	GTGATCCTCAGGTGGATCCTCTTTCTCG
MP-GL2UTR53	GAGGAGAAGAGGGAAGAGAGATCATAA
35S-Promotor-for	TCTACTCCAAGAATATCAAAAGATACAGTCTC
Klonierung	
Bastal Nos-Prom-Basta-rev	TATCGATACCGTCGACCTCGAGG
Bastall nos-Term-Basta-	NCGGTCCGAGCTTGCATGCCGGTCGATCTAG
PBS-TRY-for	NNCTCGAGCTAGTGATTCTAGATAGTAATGGATAACAC
PBS-TRY-rev	NNGAGCTCGGGATTACTAGTCACTAGGAAGGATAG
GL2 Val for	TCGATCATATGTCAATGGCCG
GL2 Val rev	TCGACGGCCATTGACATATGA
HindIII-AscI-Linker	AGCTAATGGCGGCCAT
Test-PCRs	
MP-5'-CPC-Test-for	GTTTGGGGCGGCCAGAAAGCTTTG
MP-5'-TRY-Test-for	TTGGGGCGGCTCTTAGCTTCGAAG
MP-TRY-cDNA-Test-rev	CAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGCTAGGAAGG
MP-CPC-cDNA-Test-rev	AAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTCATTTC
PARB-Test-for	CCCCGGGTGCAGGAATTCGATATC
PARB-Test-rev	TAGAGGAAGGGTCTTTGGCGGTCCAGG
PARB-Spel-Test-for	CGGCCAGTGAATTGTAATACGACTC
PARB-Spel-Test-rev	GTACAAACTTGTGATATCGAATTCCTGC

4.1.5 Verwendete Vektoren

Die folgenden Vektoren wurden zur Klonierung von Promotorfragmenten und cDNA-Sequenzen verwendet:

- **pDONR201** und **pDONR207** (Invitrogen) für die Klonierung von Promotorfragmenten über die Gateway-BP-Reaktion
- **pGEM-T-easy** (Promega) für die Klonierung weiterer PCR-Produkte
- **pBluescript KS** (Stratagene) für Subklonierungen
- **puc19** (MBI-Fermentas) für Subklonierungen
- **pENTR1A** (Invitrogen) für Subklonierungen für Gateway-LR-Reaktionen.
- **pENTR1A-ccdB**: Entfernung der Gateway-Kassette aus pENTR1A durch EcoRI-Restriktion mit nachfolgender Religation (Arp Schnittger)
- **pENTR1A-GUS**: (Bekir Ülker, MPIZ-Köln)

Als Grundlage für weitere Klonierungen wurden folgende Vektoren benutzt:

- **pBluescript-GW-RekA**: Gateway-Rekombinationskassette-A über EcoRV in pBluescript, (Stephane Biere, MPIZ-Köln)
- **pGreen-0229**: pGREENII-Vektor mit Basta-Resistenz (<http://pgreen.ac.uk>)
- **35S::5'-MPK-GL1-nos-puc18**: *GL1*-cDNA (*Ler*) mit BamHI und SacI in Derivat von puc18 (Daniel Bouyer)
- **WER-PBS**: *WER*-cDNA (*Ler*) über PCR mit 5'-BamHI- und 3'-SacI-Restriktionsschnittstellen generiert und über SmaI-Restriktionsschnittstellen in pBluescript blunt-kloniert (Daniel Bouyer)
- **TRY-PBS**: *TRY*-cDNA (*Ler*) mit 5'-KpnI- und 3'-SalI-Restriktionsschnittstellen in pBluescript (JaiDeep Mathur)
- **GL2-pGEM-T-easy**: *GL2*-cDNA über PCR mit 5'-EcoRI- und 3'-KpnI-Restriktionsschnittstellen generiert in pGEM-T-easy (Bhylahalli Purushottam Srinivas)
- **5'-TRY-pGUS1 (TRY::GUS)**: 1,4 kb genomische Sequenz vor dem endogenen Translationsstart mit 5'-HindIII- und 3'-SalI-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGUS1 (Sven Schellmann)
- **5'-CPC-pGEM-T-easy**: 1,3 kb genomische Sequenz vor dem endogenen Translationsstart wurden mit 5'-HindIII- und 3'-SalI-Restriktionsschnittstellen amplifiziert und in pGEM-T-easy ligiert (Bhylahalli Purushottam Srinivas)
- **5'-GL2-puc19**: genomische Sequenz vor dem endogenen Translationsstart aus pGL2::GUS in puc19 (Szymanski *et al.*, 1998)(HindIII-NheI-Fragment aus Col von -2132 bis -28)) (Christina Weinl)

- **GL3-pDONR201, TRY-pDONR201, AtMYB23-pDONR201:** Die cDNAs der Gene *GL3*, *TRY* und *AtMYB23* wurden über PCR mit attB-Primern generiert und in den Vektor pDONR201 durch BP-Reaktion rekombiniert (Ullrich Herrman)
- **TTG-pENTR4, CPC-pENTR4:** Die cDNAs der Gene *TTG* und *CPC* wurden über SalI und XhoI in pENTR4 kloniert. (Ullrich Herrman)
- **TTG2-ost-pDONR201:** *TTG2* -cDNA ohne Stopp-Kodon über PCR basierte BP-Reaktion in den Vektor pDONR201 (Bekir Ülker, MPIZ-Köln)

Alle verwendeten binären Vektoren basieren auf den folgenden:

- **pANGUS** (Marc Jakoby, MPIZ-Köln): Kanamyzin basierter pPAM-Vektor (Accession-Number: AY027531) mit PBT-GUS-Kassette (Feldbrügge *et al.*, 1994), die den Minimalpromotor des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV) 35S-Promotor (-46 bis +8), das Gen für die β -Glucuronidase und den Nopalinsynthese-Terminator (nos) enthält. Damit sind TATA-Box und Transkriptionsstart enthalten.
- **pAMPAT-GW:** binärer Vektor mit 35S-Promotor und anschließender Gateway-Rekombinationskassette, sowie Basta-Resistenz (Bekir Ülker, MPIZ-Köln, basiert auf pPAM, Accession Number AY027531)
- **pGL2-pAMPAT-GW:** 5'-nicht kodierende Sequenz aus pGL2::GUS (Szymanski *et al.*, 1998) gegen 35S-Promotor von pAMPAT über AscI und XhoI ausgetauscht (Christina Weinl)
- **pAMPAT-HA-GW** mit 35S-Promotor, C-terminalen-HA-Markierung (Hemagglutinin Dreifachepitope) und Basta-Resistenz (Noel Laurent D, AG Parker, MPIZ-Köln)
- **35S::mGFP5::ER (35S::GFP)** in pBIN (Jim Haseloff)
- **35S::GeBP** in pCGN1547 (Curaba *et al.*, 2003)
- **pAtML1::GFP::GL1** in pEGAD (Esch *et al.*, 2003)
- **pGGE4 (pGL1::GUS)** in pBI101 (Larkin *et al.*, 1993)

Für N-terminale Histidin-Proteinfusionen zur Expression mit dem T7-Promotor wurde der Vektor **pDEST17** (Invitrogen) verwendet.

4.1.6 Bakterienstämme

Für Standardklonierung wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 α und XL1Blue verwendet.

Bei der Anzucht und Klonierung von Destinationsvektoren für Gateway-LR-Reaktionen wurde der *E. coli* Stamm DB3.1 (Invitrogen) benutzt, der resistent für *ccdB* ist.

Proteinüberexpression fand in dem *E. coli* Stamm BL21DE3 statt, der eine chromosomale Kopie des *lacI*-Gens enthält. Dieses besteht aus dem *lacUV5* Promotor, der durch IPTG induzierbar ist, und dem Gen für die T7 RNA Polymerase (Studier und Moffatt, 1986). Für Pflanzentransformationen

wurde der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 und für Gateway basierte Vektoren der mit einem zusätzlichen Plasmid versehene GV3101 pMP90RK Stamm benutzt.

4.1.7 Pflanzenlinien

Als Wildtyp-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) wurden in dieser Arbeit die Ökotypen Landsberg *erecta* (Ler), ein Derivat des Ökotyps Landsberg-0 mit der Mutation *erecta* und Columbia-0 (Col-0) benutzt. Das mutante Allel *gl1(39F12)* befindet sich in Ler- Hintergrund und wurde von Martin Hülskamp durch EMS-Mutagenese hergestellt. Das Allel *try-82 (Ler)*, *cpc try82 (Ler, WS)*, *wer-1 (Col)* sowie die Überexpressionslinie 35S::GL1 (Col) befanden sich bereits im Labor und wurden früher beschrieben (Hülskamp *et al.*, 1994; Lee und Schiefelbein, 1999; Oppenheimer *et al.*, 1991; Schellmann *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 1997). Das Allel *gl2 (EMS)* ist in Ler-Hintergrund und wurde von Martin Hülskamp durch EMS-Mutagenese hergestellt und stellt eine Funktionsverlust-Mutante dar. Das Allel *ttg2-1 (Ler)* wurde freundlicher Weise von Bekir Ülker (MPIZ-Köln) und die Überexpressionslinie 35S::GeBP (Col) von Gilles Vachon (Grenoble) zur Verfügung gestellt und bereits vorher beschrieben (Curaba *et al.*, 2003).

Zur Kontrolle von GUS-Reporter Linien und für Kreuzungen wurden die bereits veröffentlichten Linien pGL1::GUS (pGGE4), pTRY::GUS und pWER::GUS benutzt (Larkin *et al.*, 1993; Lee und Schiefelbein, 1999; Schellmann *et al.*, 2002). Aus Kreuzungen stammen die Linien TRY::GUS *gl2(YI)* (Sven Schellmann), pGL1::GUS *gl2(EMS)*, pGL1::GUS 35S::GeBP, 35S::GL1 35S::GeBP

4.2 Allgemeine molekulare Methoden

4.2.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus jungen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Ler) erfolgte nach einer etablierten Methode (Logemann *et al.*, 1987). Dabei wurden 4-5 Blätter mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff homogenisiert und anschließend bei -80°C gelagert.

100 bis 300 mg des homogenisierten Gewebes wurden mit 400 µl Z6-Puffer (8M Guanidin-HCl, 20 mM MES, 20 mM EDTA, 50 mM β-Mercaptoethanol (Zugabe direkt vor Gebrauch) pH 7,0 (mit 3M NaOH eingestellt) gemischt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation (10 min, 13 krpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und das Pellet erneut mit 200 µl Z6-Puffer gemischt und wiederholt zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und nach Zugabe von 0,7 Volumen 100%igem Ethanol und 0,05 Volumen Essigsäure mindestens 30 min bei -80°C inkubiert. Erneute Zentrifugation führt zur vollständigen Präzipitation der RNA. Das Pellet wurde zuerst mit 1 ml 3M Natriumacetat (pH 5,0) und dann mit 1ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl Aqua bidest. bei 50°C für maximal 30 min gelöst. Erneute Fällung mit 2 Volumen 100% Ethanol und 0,1 Volumen 3M Natriumacetat über Nacht bei

-20°C diente zur weiteren Reinigung der RNA. Anschließend erfolgte Zentrifugation für 30 min. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Aqua bidest. aufgenommen und die OD bei 260 und 280 nm bestimmt.

4.2.2 Isolation pflanzlicher genomischer DNA

Für präparative und analytische PCR-Zwecke wurde die CTAB-Präparation von genomischer DNA aus Pflanzen benutzt (Doyle und Doyle, 1990; Rogers und Bendich, 1985).

Für das Southern Blotting wurde genomische DNA nach dem folgenden Protokoll isoliert:

2-3 Rosettenblätter wurden in flüssigem Stickstoff geerntet und in 2 ml Gefäßen mit Pistill unter flüssigem Stickstoff im Eppendorf-Gefäß homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml auf 60°C vorgewärmter Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM EDTA (pH 8,0); 500 mM NaCl, 1,6% SDS; vor Gebrauch frisch zugeben: 10 mM β-Mercaptoethanol) zugefügt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 5M K-Acetat erfolgte eine weitere Inkubation für 10 bis 60 min auf Eis.

Nach Zentrifugation (10 min, 13 krpm, 4°C) wurde der Überstand zu vorgelegten 800 µl Chloroform abgegossen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 12 krpm, 22°C) wurde der Überstand zu 500 µl Isopropanol gegeben und gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 15 krpm, 10°C) wurde das Pellet getrocknet und dann in 50 µl TE mit RNase (100 µg/ml) gelöst.

4.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Plasmidisolation aus Bakterien erfolgte nach der Methode von (Birnboim und Doly, 1979). Für spezielle Anwendungen wurde der Säulen pEQ-LAB Plasmid Miniprep KitI nach dem Hersteller-Protokoll benutzt. Für die Bereitstellung großer Plasmid-DNA Mengen die Quiagen Plasmid Midiprep- und Maxiprep-Kits und für die Plasmidpräparation aus Agrobakterien wurde der Quiagen Plasmid Miniprep Kit, wie in den Benutzerhandbüchern angegeben, angewendet.

4.2.4 DNA-Manipulation

DNA- Manipulationen und Klonierungen wurden gemäß der allgemeinen molekularbiologischen Methodenliteratur (Ausubel *et al.*, 1994; Sambrook und Russel, 2001) durchgeführt. Die Klonierung über die BP- und LR-Rekombination erfolgte gemäß dem Handbuch „Gateway Cloning Technology“ des Hersteller Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>). Alle PCR- Fragmente wurden vor der weiteren Verwendung sequenziert. Die Sequenzierung wurde an einem ABI 310 Prism (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, CA) gemäß des Herstellers vorgenommen. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Big-Dye Kit 1.1 und 3.1 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) ausgeführt. Die Sequenzierprimer wurden mit der Software VectorNTI-Suite 7.1 (Informax, Paisley PA4 9RF, United Kingdom) konstruiert.

4.2.5 PCR-Bedingungen

Die Polymerasekettenreaktion wurde gemäß der Standardmethoden ausgeführt. Dabei wurde der Ablauf wie folgt gewählt:

95°C 2min; (95°C 30s, T_a 30s, 72°C Xs)_{30mal}; 72°C 5min; 18°C

Die Annealing-Temperatur (T_a) wurde entsprechend der benutzten Oligonukleotiden gewählt und die Elongationszeit entsprechend der Fragmentlänge, dabei wurde die Regel angewendet das 1000bp in einer Minute elongiert werden. Einzige Ausnahme stellten PCR-Reaktionen mit der Pfu-Polymerase dar, bei denen mit der doppelten Zeitangabe im Vergleich zur obigen Regel gearbeitet wurde.

Für präparative Zwecke wurde die High Fidelity TAQ-Polymerase (MBI-Fermentas) eingesetzt. In Ausnahmefällen (Fusion- und Mutations-PCR) wurde die Pfu-Polymerase (MBI-Fermentas) genutzt. Für andere Anwendungen wurde die TAQ-Polymerase von einer der oben angegebenen Firmen eingesetzt. Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion wurden die Mastercycler und Mastercycler Gradient von Eppendorf eingesetzt.

Für die Fusion von PCR-Produkten wurde ein modifiziertes PCR-Programm benutzt, das vor den eigentlichen Zyklen einen Zyklus zur Fusion zweier Subfragmente enthält, indem die Matrizen verlängert werden: 95°C 10min, 56°C 10min, 72°C 10 min.

Für die Sequenzierung mit dem Big-Dye-Kit wurde folgendes PCR-Programm gewählt:

94°C 2min; (94°C 20s, 55°C 30s, 60°C 4min)_{35mal}; 60°C 6min; 18°C

4.2.6 Mutagenese und Fusion von PCR-Fragmenten

Zur Mutagenese und Fusion von PCR-Produkten wurde eine Methode gewählt, bei der im Fall der Mutagenese die Punktmutationen bzw. Mutation eines cis-regulatorischen Elements oder die Fusion durch sequentielle PCR durchgeführt wurde.

Die Primer, die die Mutation einführen bzw. die Fusion ermöglichen, sollten einander mit mindestens 15-20 bp überlappen und zu Ihrer Matrize ebenfalls über 15-20 bp homolog sein. Die Mutation sollte möglichst an dem 5'-Ende des Primers liegen.

Die PCR wurde zuerst mit den Primern A und B bzw. C und D ausgeführt (s. Abb. 123). Dabei wurde die Pfu-Polymerase benutzt, die keine Nukleotide am 3'-Ende anhängt. Die PCR wurde nach dem Standardprotokoll ausgeführt (s. 5.2.5). Nach Reinigung des PCR-Produktes wurden je 2µl dieser PCR-Produkte mit den Primern A und D gemäß dem Protokoll der Fusions-PCR fusioniert und amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde dann über eine BP-Reaktion in den Vektor pDONR201 rekombiniert.

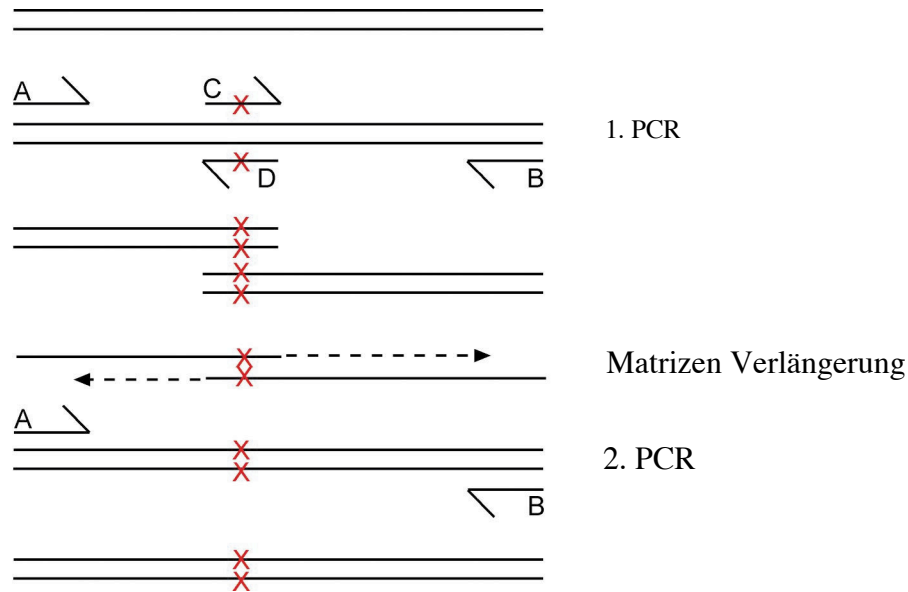


Abbildung 123: Prinzip der Einführung von Punktmutationen in DNA durch sequentielle PCRs

4.2.7 Reverse Transkription und Amplifikation von cDNA-Enden

Um die 5'-UTR der cDNA des Gens *GLI* zu bestimmen, wurde eine 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) durchgeführt. Dazu wurde das 5'/3'-RACE-Kits (Roche) gemäß dem Hersteller-Protokoll eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte mit 5µg *Ler*-RNA mittels der AMV reversen Transkriptase bei 55°C für 60 min und anschließender Inhibition bei 65°C für 10 min. Als Oligonukleotid diente der Oligo-dT₁₈. Nach Reinigung der cDNA mit dem High Pure PCR Purification Kit und Elution in 50µl Tris-Puffer (pH 7,2) folgte das C-Tailing mit 2mM dCTP anstelle von dATP, das im Kit vorgegeben ist.

Die anschließenden PCRs erfolgten mit den selbst konstruierten Oligonukleotiden gemäß Tab. 21. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel eluiert, in pGEM-T-easy-Vektor kloniert und sequenziert.

Tabelle 21: Benutzte Oligonukleotide für die 5'-RACE des Gens GL1

cDNA-Synthese	1. PCR Vorwärtsprimer	1. PCR Rückwärtsprimer	2. PCR Vorwärtsprimer	2. PCR Rückwärtsprimer
Oligo-dT ₁₈	oligo(DG)anchor	5'-GL1-RACE-rev-4	anchor	5'-GL1-RACE-rev-1
Oligo-dT ₁₈	oligo(DG)anchor	5'-GL1-RACE-rev-4	anchor	5'-GL1-RACE-rev-2
Oligo-dT ₁₈	oligo(DG)anchor	5'-GL1-RACE-rev-4	anchor	5'-GL1-RACE-rev-3
Oligo-dT ₁₈	oligo(DG)anchor	5'-GL1-RACE-rev-4	anchor	5'-GL1-RACE-rev-5

4.2.8 Southern Blotting

Nachdem die DNA aus dem pflanzlichem Material isoliert wurde (s. 4.2.2), wurde die gesamte DNA mit XbaI verdaut. Dabei wurden je 50µl DNA mit 3µl XbaI in einem Gesamtvolumen von 150µl versetzt und nach 4 h Inkubation erfolgte erneute Zugabe von 2 µl XbaI. Dann wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Fällung mit 375µl 100%igem Ethanol und 15µl 3M Natriumacetat bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat 20min bei 13krpm und Raumtemperatur zentrifugiert und

anschließend mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Proben in 40 μ l TE- Puffer aufgenommen und mit 10x Auftragspuffer nach 10-minütiger Denaturierung bei 65°C in einem 0,8%igem, 13,5 cm langem Agarosegel bei 35V über Nacht aufgetrennt.

Dann wurde das Agarosegel in Depurinierungslösung für 20 min inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. In Folge wurde dann mit der Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung ebenso verfahren.

Die Übertragung der DNA auf positiv geladene Nylon HybondTM-N⁺-Membran (Amersham Life Science) erfolgte mit 20xSSC Hochsalzpuffer durch aufwärtsgerichteten Kapillartransfer über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Blot, nachdem er kurz in 2xSSC gewaschen wurde, 2 Stunden bei 80°C inkubiert, um die DNA feste an den Blot zu binden. Eine für das GUS-Gen spezifische DIG-markierter DNA-Sonde wurde mittels des PCR DIG Labeling Mix (Roche) von Daniel Bouyer hergestellt und hier eingesetzt. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte gemäß der Anleitung des DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). Die Visualisierung wurde mit Hilfe der Chemilumineszenz empfindlichen Filme HyperfilmTMECL (Amersham Biosciences) mit der Entwicklermaschine Optimac (Protec) durchgeführt.

20xSSC: 3M NaCl, 0,3M Na₃Citrat, pH 7,0

Depurinierungslösung: 0,25M Salzsäure

Denaturierungslösung: 1,5M NaCl, 0,5M NaOH

Neutralisierungslösung: 1,5M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,0

4.3 Konstrukte

4.3.1 Herstellung der Destinationsvektoren für die Gateway-LR-Reaktionen

Herstellung des Destinationsvektors PARB

Durch BcuI und SalI Verdau wurde die Gateway-Rekombinationskassette aus dem Vektor pBluescript-GW-RekA herausgeschnitten und über dieselben Schnittstellen in den Vektor pANGUS gebracht. Die Kanamycin-Resistenz des entstandenen Vektors pANGUS-RekA wurde gegen die Basta-Resistenz ausgetauscht. Dazu wurde die Basta-Resistenz des Vektors pGREEN-Bar mit den Oligonukleotiden *BastaI* und *BastaIII* amplifiziert, in pGEM-T-easy subkloniert und nach Sequenzierung über RsrII und SpeI in den Vektor pANGUS-RekA gebracht, wodurch der Vektor PARB (pANGUS-RekA-Basta) entstand. Dieser Vektor diene als Basis für vielfältige Derivate.

Insertion der nicht-kodierenden 3'-Bereiche von GLI, TRY und WER in PARB über Restriktionsschnittstellen

Die 3'-Bereiche von *GLI* und *WER* wurden über PCR auf genomische DNA des *Ler*-Ökotypes amplifiziert und in pGEM-T-easy subkloniert.

Dabei wurden die in Tab. 22 aufgeführten Oligonukleotide benutzt. Diese enthielten die Restriktionsschnittstellen SpeI oder ApaI, um den 3'-Bereich in 5'-Position zu bringen (d.h. vor den 5'-kodierenden Bereich). Über die BglII Schnittstelle wurde der 3'-Enhancerbereich von *GLI* in 3'-Position hinter den nos-Terminator des PARB-Vektors eingebracht.

Tabelle 22: Liste der amplifizierten, nicht-kodierenden 3'-Fragmente

Liste der verwendeten 3'-nicht-kodierenden Bereiche der Gene *GLI* und *WER*, die über PCR amplifiziert und über Restriktionsschnittstellen in PARB eingeführt wurden. Die Start- und Stopp-Position gibt die genomische Position relativ zum endogenen Translationsstart des jeweiligen Gens an. Die Oligonukleotide enthalten zusätzliche Basen zum Einfügen der Restriktionsschnittstellen.

Fragment	DNA	Restriktions-schnittstelle	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	START	STOPP	T _a
3'- <i>GLI</i>	Ler-genomisch	SpeI	3'-GL1-for-SpeI	3'-GL1-rev-SpeI	2407	2922	57°C
3'- <i>GLI</i>	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	BglII	3'-GL1-for-BglII	3'-GL1-rev-BglII	2407	2922	55°C
3'- <i>GLI</i> -28	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	SpeI	3'-GL1-for-SpeI	3'-GL1-InI-rev-SpeI	2407	2603	56°C
3'- <i>GLI</i> -29	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	SpeI	3'-GL1-for-SpeI	3'-GL1-InII-rev-SpeI	2407	2741	56°C
3'- <i>GLI</i> -30	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	SpeI	3'-GL1-InI-forN-SpeI	3'-GL1-InII-rev-SpeI	2558	2741	56°C
3'- <i>GLI</i> -31	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	SpeI	3'-GL1-InI-forN-SpeI	3'-GL1-rev-SpeI	2558	2922	56°C
3'- <i>GLI</i> -32	3'-GL1-E-SpeI-pGEM-T	SpeI	3'-GL1-InI-forN-SpeI	3'-GL1-rev-SpeI	2724	2922	56°C
3'- <i>WER</i>	Ler-genomisch	ApaI	WER-F4-sen-ApaI	WER-F4-asen-ApaI	1084	2145	62°C

Die Fragmente 3'-*GLI* und 3'-*WER* wurden in beiden Orientierung weiterbenutzt. Dabei entstanden die Destinationsvektoren PARB-3'-GL1-for, PARB-3'-GL1-rev, PARB-3'-WER-for und PARB-3'-WER-rev. Die 3'-GL1-Fragmente-28 bis -29 lieferten die Destinationsvektoren PARB-28 bis -32, wobei nur die *in Vivo* –Vorwärtsorientierung benutzt wurde.

Einführung kleiner Promotorfragmente über Linker in PARB und PARB-33

Da sich sehr kleine Fragmente durch PCR schlecht amplifizieren lassen, wurde bei Fragmentgrößen unter 50 bp die Strategie der Linker-Ligation gewählt. Hierzu wurde ein 1:1-Gemisch von homologen Oligonukleotid-Paaren, deren Enden die überhängenden Enden der jeweiligen gewünschten Restriktionsschnittstelle darstellen, 5min auf 95 °C zum Hybridisieren erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, dabei wurde jeder Primer in einer Konzentration von 100mM eingesetzt. In der anschließenden Ligation wurde das Gemisch 1:10 verdünnt und 1µl in einem 10µl Ligationsansatz eingesetzt.

Kleinere Fragmente des 3'-GL1-Enhancerbereiches von 25 und 40 bp-Größe wurden über die SpeI-Schnittstelle von PARB als Linker eingebracht: Dabei wurden die Oligonukleotid-Paare PCR-Linker-67-for und –rev-na, PCR-Linker-68-for und –rev-na, PCR-Linker-74-for und –rev-na und PCR-Linker-75-for und –rev-na eingesetzt.

Ebenso wurde mit einem 5'-TRY-Fragment verfahren, dessen Größe 35 bp betrug, hierzu wurden die Oligonukleotidpaare PCR-Linker-71-for und –rev-na verwendet und in PARB-33 über SpeI ligiert. Für das kleinste 5'-CPC-Fragment (48bp) wurde das Oligonukleotidpaar PCR-Linker-77-for und –rev-na in PARB über SpeI eingebracht. Die genaue, genomische Positionierung der Linker

kann Tab. 23 entnommen werden. Dadurch entstanden die Destinationsvektoren PARB-67, -68, -71, -74, -75 und -77.

Tabelle 23: Liste der Linker als Promotorfragmente

Liste der eingesetzten Linker, die die verschiedenen Promotorregionen der Gene *GL1*, *TRY* und *CPC* liefern. Die Start- und Stopp-Position gibt die genomische Position relativ zum endogenen Translationsstart des jeweiligen Gens an.

Promotorregion	Linker	Start	Stopp	Länge (bp)
3'- <i>GL1</i>	Linker-67	2567	2606	40
3'- <i>GL1</i>	Linker-68	2737	2776	40
3'- <i>GL1</i>	Linker-74	2574	2598	25
3'- <i>GL1</i>	Linker-75	2735	2759	25
5'- <i>TRY</i>	Linker-71	-245	-211	35
5'- <i>CPC</i>	Linker-77	-474	-428	47

Klonierung des proximalen 5'-*TRY*-Bereiches (-4 bis -176)

Das Fragment des 5'-nicht-kodierenden Bereiches des *TRY*-Gens (-4 bis -176) wurde mit den Primern 5'-*TRY*-179-HindIII-for und 5'-*TRY*-179-HindIII-rev über PCR amplifiziert, wobei die HindIII-Restriktionsschnittstellen direkt mittels PCR generiert wurden, in pGEM-T-easy subkloniert (pGEM-T-33) und in PARB vor den 35S-Minimalpromotor über HindIII eingebracht, wodurch PARB-33 generiert wurde.

Austausch des *GUS*-Gens von PARB und Derivaten gegen die cDNAs von *GL1*, *TRY* und *WER*

Die *GL1*-cDNA wurde aus dem Vektor 35S::5'-MPK-*GL1*-nos-puc18 über BamHI und SacI in puc19 umklont zu *GL1*-puc19. Die *WER*-cDNA wurde aus dem Vektor *WER*-PBS mit BamHI ausgeschnitten und erneut in PBS über BamHI eingebracht, wobei der Vektor *WER*-PBS-II entstand. Dabei wurde die Orientierung so selektiert, dass die XhoI-Schnittstelle vor dem 5'-Bereich der cDNA positioniert war. Die *TRY*-cDNA wurde über PCR mit XhoI- und SacI-Schnittstelle generiert und in pGEM-T kloniert zu *TRY*-pGEM-T. Dabei diente der Vektor *TRY*-pBS als Matrice.

Die cDNAs der Gene *GL1*, *TRY* und *WER* wurden aus den oben generierten Vektoren als XhoI-SacI-Fragment ausgeschnitten und gegen das *GUS*-Gen des PARB-Vektors und seiner Derivate ausgetauscht.

Die *GL1*-cDNA wurde in PARB, PARB-3'-*GL1*-rev, PARB-28, PARB-29; PARB-30; PARB-31, PARB-32 und PARB-33. Die *WER*-cDNA wurde in PARB und PARB-3'-*WER*-for und die *TRY*-cDNA in PARB und PARB-33 ligiert.

Entfernung der Gateway-Rekombinationskassette aus PARB und seinen Derivaten

Die Vektoren PARB, PARB-3'-*GL1*-for, PARB-3'-*GL1*-rev, PARB-28, PARB-29, PARB-30, PARB-31 und PARB-32 wurden mit PstI und HindIII geschnitten, die Überhänge eliminiert und religiert.

Herstellung von 5'-TRY-pAMPAT und 5'-CPC-pAMPAT

Aus dem Vektor 5'-TRY-pGUS1 wurde der 5'-TRY-Promotor über HindIII und SalI ausgeschnitten und über diese Schnittstellen in pBS eingebracht. 5'-TRY-PBS und 5'-CPC-pGEM-T-easy wurden mit HindIII verdaut und eine AscI-Schnittstelle wurde über einen HindIII-AscI-Linker eingeführt. Anschließend wurde der 5'-TRY-Promotor als AscI-XhoI- und der 5'-CPC-Promotor als AscI-SalI-Fragment in die AscI und XhoI-Schnittstellen des pAMPAT-GW-Vektors eingeführt.

4.3.2 Herstellung der Entry-Klone für die Gateway-LR-Reaktionen

Konstruktion von Entry-Klonen über Klonierung

Die 5'- nicht-kodierende Sequenz des *GL2*-Gens (Szymanski, 1998) wurde aus dem Vektor 5'-GL2-puc19 mit BamHI und HindIII ausgeschnitten und über diese Restriktionsschnittstellen eingefügt. Anschließend wurde die Promotorregion aus diesem Vektor über NotI und Acc65I ausgeschnitten und in pENTR1A-ccdB eingefügt, so dass der Vektor 5'-GL2-pENTR1A entstand. Die *GL1*-cDNA wurde aus GL1-puc19 (s. 4.3.1) über EcoRI und SalI, die *WER*-cDNA aus WER-PBS-II (s.4.3.1) mit den Enzymen SalI und NotI und die *GL2*-cDNA aus GL2-pGEM-T-easy mittels der Enzyme EcoRI und NotI ausgeschnitten und über die jeweiligen Restriktionsschnittstellen in pENTR1A-ccdB eingefügt, dadurch wurden GL1-, WER- und GL2-pENTR1A hergestellt.

Da die Sequenz zwischen Rekombinationsstelle und Start-Kodon von GL2-pENTR1A 23 Kodons besitzt, wurde dieser Bereich auf 11 Kodons reduziert, indem mit SalI verdaut und ein Sal-Linker über das Oligonukleotidpaar GL2-Val-for und GL2-Val-rev mit einer kürzeren Sequenz eingesetzt wurde. Dadurch wurde der Vektor GL2-pENTR1A-Link produziert.

Konstruktion von Entry-Klonen über PCR basierte BP-Reaktion

Die Entry-Klone, die die cDNAs ohne Stopp-Kodon enthalten, wurden über PCR mit Attachment-Stellen attB1 bzw. attB2 für die Gateway BP-Reaktion erzeugt. Die als Vorlage dienende DNA und die verwendeten Primer sind der Tab. 24 zu entnehmen.

Tabelle 24: Liste der cDNA-Entry-Klone ohne Stopp-Kodon

Liste der Entry-Vektoren mit der benutzten Vektor-DNA, den Primern und der Annealingtemperatur, um die cDNAs der Gene *GL1*, *GL2*, *GL3*, *TTG*, *TRY*, *WER* und *AtMYB23* ohne Stopp-Kodon zu generieren.

Generierter Vektor	Vektor als Vorlage	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Annealingtemperatur
GL1-ost-pDONR201	GL1-pENTR1A	GL1-Stop-attB1	GL1-Stop-attB2T-N	57°C
GL2-ost-pDONR201	GL2-pENTR1A-Link	GL2-Stop-attB1	GL2-Stop-attB2T-N	57°C
GL3-ost-pDONR201	GL3-pDONR201	GL3-Stop-attB1	GL3-Stop-attB2T-N	57°C
TTG-ost-pDONR201	TTG-pENTR4	TTG-Stop-attB1	TTG-Stop-attB2T-N	57°C
TRY-ost-pDONR201	TRY-pDONR201	TRY-Stop-attB1	TRY-Stop-attB2T-N	57°C
CPC-ost-pDONR201	CPC-pENTR4	CPC-Stop-attB1	CPC-Stop-attB2T-N	57°C
WER-ost-pDONR201	WER-pENTR1A	WER-Stop-attB1	WER-Stop-attB2T-N	57°C
AtMYB23-ost-pDONR201	T1-pDONR201	T1-stop-attB1 MP	T1-stop-attB2T-MP1	57°C

Die PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert und mittels BP-Reaktion in den Vektor pDONR201 rekombiniert.

Zur Synthese der meisten untersuchten Promotorfragmente (Ausnahme s. 4.3.1) wurde ebenfalls die PCR basierte BP-Reaktion zur Erzeugung von Entry-Klonen benutzt. Dabei wurde genomische DNA des *Ler*-Ökotyps, soweit nicht anders vermerkt, verwendet. Die erzeugten Promotorfragmente, die eingesetzten Primer, sowie die Annealingtemperaturen sind der Tab. 25 zu entnehmen. Für die PCR-Fragmente Pr1-24 wurde der Vektor pDONR207 und für alle weiteren Reaktionen der Vektor pDONR201 zur BP-Rekombination benutzt.

Die interne PCR-Nummer wurde als Nomenklatur für die Entry-Klone benutzt, z.B. PCR1 liefert Pr1 (Promotorfragment 1 in pDONR201 oder pDONR207).

Tabelle 25: Liste der amplifizierten Promotorfragmente für die BP-Reaktion

Liste der amplifizierten Promotorfragmente mit verwendeten Primern und Annealingtemperatur. Die Start- und Stopp-Position gibt die genomische Position relativ zum endogenen Translationsstart des jeweiligen Gens an.

Genom. Bereich	PCR-/Pr-Nr.	Primer-Nr.	Primer	DNA	Ta Produktlänge			
					(°C)	(bp)	Start	Stopp
5'-GL1	1	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	57	479	-1362	-884
		2	GL1-F1-ase-attB2					
5'-GL1	3	4	GL1-F2-sen-attB1	Ler	50	530	-923	-394
		5	GL1-F2-ase-attB2					
5'-GL1	5	7	GL1-F3-sen-attB1	Ler	50	397	-520	-124
		8	GL1-F3-ase-attB2					
5'-GL1	7	10	GL1-F4-sen-attB1	Ler	58	256	-380	-124
		8	GL1-F3-ase-attB2					
5'-GL1	9	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	56	1239	-1362	-124
		8	GL1-F3-ase-attB2					
3'-GL1	11	12	GL1-F5-sen-attB1	Ler	58	509	2410	2918
		13	GL1-F5-ase-attB2					
5'-TRY	13	15	TRY-F1-sen-attB1	Ler	48	935	-1814	-880
		16	TRY-F1-ase-attB2					
5'-TRY	14	17	TRY-F2-sen-attB1	Ler	56	646	-1164	-519
		18	TRY-F2-ase-attB2					
5'-TRY	15	19	TRY-F3-sen-attB1	Ler	56	448	-623	-176
		20	TRY-F3-ase-attB2					
5'-TRY	16	15	TRY-F1-sen-attB1	Ler	56	1639	-1814	-176
		20	TRY-F3-ase-attB2					

5'-CPC	17	21	CPC-F1-sen-attB1	Ler	56	199	-538	-340
		22	CPC-F1-asen-attB2					
5'-WER	18	23	WER-F1-sen-attB1	Ler	52	776	-2026	-1251
		24	WER-F1-asen-attB2					
5'-WER	19	25	WER-F2-sen-attB1	Ler	52	736	-1359	-624
		26	WER-F2-asen-attB2					
5'-WER	20	27	WER-F3-sen-attB1	Ler	50	658	-819	-162
		28	WER-F3-asen-attB2					
5'-WER	21	23	WER-F1-sen-attB1	Ler	50	1869	-2026	-162
		28	WER-F3-asen-attB2					
5'-TRY	23	20	TRY-F3-asen-attB2	Ler	62	249	-424	-176
		31	TRY-F4-sen-attB1					
5'-CPC	24	32	CPC-F2-sen-attB1	Ler	62	529	-686	-158
		33	CPC-F2-asen-attB2					
5'-GL1	9a	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	66	1346	-1362	-17
		50	GL1-F6-asen-attB2					
5'-GL1	41	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	57	969	-1362	-396
		5	GL1-F2-asen-attB2					
5'-GL1	42	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	52	479	-1362	-884
		51	MP-GL1-Kombi-2+7-rev					
5'-GL1	43	1	GL1-F1-sen-attB1	Ler	52	479	-1362	-884
		52	MP-GL1-Kombi-2+10rev					
5'-GL1	45	54	MP-GL1-Kombi-10+2-for	Ler	52	256	-380	-124
		8	GL1-F3-asen-attB2					
5'-GL1	46	53	MP-GL1-Kombi-7+2-for	Ler	50	504	-520	-17
		50	GL1-F6-asen-attB2					
5'-GL1	47	54	MP-GL1-Kombi-10+2-for	Ler	52	398	-380	-17
		50	GL1-F6-asen-attB2					
5'-GL1	49	1	GL1-F1-sen-attB1	PCR43+45	53	479	-1362	-884
		8	GL1-F3-asen-attB2			256	-380	-124
5'-GL1	50	1	GL1-F1-sen-attB1	PCR 42+46	51	479	-1362	-884
		50	GL1-F6-asen-attB2			504	-520	-17
5'-GL1	51	1	GL1-F1-sen-attB1	PCR 43+47	53	479	-1362	-884
		50	GL1-F6-asen-attB2			398	-380	-17
5'-WER	52	55	WER-F5-sen -attB1	Ler	50	627	-1250	-624
		26	WER-F2-asen-attB2					
5'-WER	53	55	WER-F5-sen -attB1	Ler	48	501	-1250	-750
		56	WER-F6-asen-attB2					
5'-WER	54	55	WER-F5-sen -attB1	Ler	50	530	-1250	-721
		57	WER-F5-asen-attB2					
5'-WER	55	25	WER-F2-sen -attB1	Ler	48	609	-1358	-750
		56	WER-F6-asen-attB2					
5'-WER	56	25	WER-F2-sen -attB1	Ler	50	638	-1358	-721
		57	WER-F5-asen-attB2					
5'-WER	57	58	WER-F7-sen -attB1	Ler	48	161	-160	1
		59	WER-F7-asen-attB2					
5'-WER	58	60	WER-F6-sen -attB1	Ler	50	252	-251	1
		59	WER-F7-asen-attB2					
5'-WER	59	61	WER-F8-sen -attB1	Ler	48	581	-741	-161
		28	WER-F3-asen-attB2					
5'-WER	60	62	WER-F9-sen -attB1	Ler	50	547	-707	-161
		28	WER-F3-asen-attB2					
5'-WER	61	63	WER-F10-sen -attB1	Ler	48	481	-641	-161
		28	WER-F3-asen-attB2					
5'-GL1	62	4	GL1-F2-sen-attB1	Ler	56	799	-923	-124
		8	GL1-F3-asen-attB2					
5'-GL1	63	4	GL1-F2-sen-attB1	Ler	56	907	-923	-17
		50	GL1-F6-asen-attB2					
5'-GL1	64	12	GL1-F5-sen-attB1	Pr11	68	172	2407	2578

		65	Primer65-attB2						
5'-GL1	65	66	Primer66-attB1	Pr11	62	145	2593	2737	
		67	Primer67-attB2						
5'-GL1	66	68	Primer68-attB1	Pr11	66	146	2777	2922	
		13	GL1-F5-asen-attB2						
5'-TRY	73	31	TRY-F4-sen-attB1	Pr23	63	190	-424	-235	
		81	TRY-F4-asen-attB2						
5'-GL1	78	90	GL1-F0-sen-attB1	Ler	56	1288	-1380	-124	
		8	GL1-F3-asen-attB2						
5'-GL1	79	90	GL1-F0-sen-attB1	Ler, Col	56	1395	-1411	-17	
		50	GL1-F6-asen-attB2						
5'-TRY	80	91	Try-Linker69-PCR-for	Pr16	55	78	-273	-196	
		92	Try-Linker69-PCR-rev						
5'-TRY	81	91	Try-Linker70-PCR-for	Pr16	55	64	-273	-210	
		93	Try-Linker70-PCR-rev						
5'-GL1	82	1	GL1-F1-sen-attB1	Pr1	58	221	-1362	-1142	
		94	Primer-94-attB2						
5'-GL1	83	95	Primer-95-attB1	Pr1	58	192	-1203	-1012	
		96	Primer-96-attB2						
5'-GL1	84	95	Primer-95-attB1	Pr1	58	243	-1203	-961	
		97	Primer-97-attB2						
5'-GL1	85	98	Primer-98-attB1	Pr1	58	148	-1031	-884	
		2	GL1-F1-asen-attB2						
5'-GL1	86	99	GL1-Fragment in Pr1-for	Pr1	58	98	-981	-884	
		2	GL1-F1-asen-attB2						
GL1-Intron1	87	100	GL1-Intron1-Ler-for-attB1	Ler	56	100	139	227	
		101	GL1-Intron1-rev-attB2						
3'-GL1	97	114	28-del-5'-40-attB1	R11	56	157	2447	2603	
		113	3'-GL1-In1-rev-attB2						
3'-GL1	98	115	28-Del-5'-80-attB1	R11	56	117	2487	2603	
		113	3'-GL1-In1-rev-attB2						
3'-GL1	99	116	28-del-5'-120-attB1	R11	56	77	2527	2603	
		113	3'-GL1-In1-rev-attB2						
3'-GL1	102	118	3'-GL1-InI-forN-attB1	R11	56	99	2558	2656	
		120	30-del-3'-ab-99-attB2						
3'-GL1	103	118	3'-GL1-InI-forN-attB1	R11	56	143	2558	2700	
		121	30-del-3'-ab-143-attB2						
3'-GL1	104	122	3'-GL1-InII-for-attB1	R11	56	53	2724	2776	
		123	32-del-3'-ab-53-attB2						
3'-GL1	105	122	3'-GL1-InII-for-attB1	R11	56	97	2724	2820	
		124	32-del-3'-ab-97-attB2						
3'-GL1	106	122	3'-GL1-InII-for-attB1	R11	56	136	2724	2859	
		125	32-del-3'-ab-136-attB2						
3'-GL1	107	122	3'-GL1-InII-for-attB1	R11	56	182	2724	2905	
		126	32-del-3'-ab-181-attB2						
5'-TRY	108	127	Primer-72-for-mit-attB1	Pr23	56	50	-245	-196	
		92	Try-Linker69-PCR-rev						
5'-CPC	110	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	80	-538	-459	
		129	17-del-3'-ab-81-attB2						
5'-CPC	111	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	120	-538	-419	
		130	17-del-3'-ab-121-attB2						
5'-CPC	112	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	160	-538	-379	
		131	17-del-3'-ab-161-attB2						
5'-CPC	113	132	17-del-5'-40-attB1	Pr17	56	160	-498	-340	
		22	CPC-F1-asen-attB2						
5'-CPC	114	133	17-del-5'-80-attB1	Pr17	56	120	-458	-340	
		22	CPC-F1-asen-attB2						
5'-CPC	115	134	17-del-5'-120-attB1	Pr17	56	80	-418	-340	
		22	CPC-F1-asen-attB2						

3'-GL1	117	136	30-del-5'-ATHB1AT-MYC-MYB-for-attB1	pGEM-T-30	58	77	2665	2741
		137	30-del-5'-rev-attB2					
5'-CPC	121	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	124	-538	-415
		143	MP-Pr17-mutidentTRY-Fr1-rev					
5'-CPC	122	22	CPC-F1-asen-attB2	Pr17	56	113	-452	-340
		144	MP-Pr17-mutidentTRY-Fr2-for					
5'-CPC	125	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	87	-538	-452
		147	MP-Pr17-mutMYB1-Fr1-rev					
5'-CPC	126	22	CPC-F1-asen-attB2	Pr17	56	147	-486	-340
		148	MP-Pr17-mutMYB1-Fr2-for					
5'-CPC	127	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	124	-538	-415
		149	MP-Pr17-mutMYB2-Fr1-rev					
5'-CPC	128	22	CPC-F1-asen-attB2	Pr17	56	113	-452	-340
		150	MP-Pr17-mutMYB2-Fr2-for					
5'-CPC	129	21	CPC-F1-sen-attB1	Pr17	56	53	-538	-486
		151	MP-Pr17-mutW-Box1-Fr1-rev					
5'-CPC	130	22	CPC-F1-asen-attB2	Pr17	56	181	-520	-340
		152	MP-Pr17-mutW-BOX1-Fr2-for					
5'-CPC	143	21	CPC-F1-sen-attB1	PCR 121	56	199	-538	-340
		22	CPC-F1-asen-attB2	+122				
5'-CPC	145	21	CPC-F1-sen-attB1	PCR 125	56	199	-538	-340
		22	CPC-F1-asen-attB2	+126				
5'-CPC	146	21	CPC-F1-sen-attB1	PCR 127	56	199	-538	-340
		22	CPC-F1-asen-attB2	+128				
5'-CPC	147	21	CPC-F1-sen-attB1	PCR 129	56	199	-538	-340
		22	CPC-F1-asen-attB2	+130				

4.3.3 Herstellung der finalen GUS-Reporter-, Rettungs- und Expressionskonstrukte

Herstellung der GUS-Reporter-Konstrukte und der Rettungskonstrukte

Die Konstrukte 35S::GUS-pAMPAT, 5'-TRY::GUS-pAMPAT und 5'-CPC::GUS-pAMPAT entstanden durch Rekombination von pENTR1A-GUS mit pAMPAT-GW, 5'-TRY-pAMPAT und 5'-CPC-pAMPAT. 35S::GUS-pAMPAT diente als Grundlage für die Synthese von 35S::GUS-3'-GL1-for und 35S::GUS-3'-GL1-rev, indem der 3'-GL1-Enhancer aus 3'-GL1-pGEM-T mit SpeI ausgeschnitten und mit demselben Restriktionsenzym in 35S::GUS-pAMPAT hinter das GUS-Gen kloniert wurde. Dabei führte die Orientierung, die der *InVivo*-Richtung entspricht zu der Bezeichnung „for“ und die der umgekehrten Richtung zu „rev“.

Die Konstrukte 35S::GL1-pAMPAT und pGL2::GL1-pAMPAT wurden durch LR-Rekombination von GL1-pENTR1A mit den Destinationsvektoren pAMPAT-GW und pGL2-pAMPAT-GW durchgeführt. Aus 35S::GL1-pAMPAT wurden die Derivate 35S::GL1-3'-GL1-for und 35S::GL1-3'-GL1-rev mittels derselben Strategie hergestellt, die für 35S::GUS-3'-GL1 verwendet wurde.

Zur Herstellung verschiedener GUS- und Rettungskonstrukte mit diversen Promotorfragmenten wurden die in Tab. 26 und Tab. 27 aufgeführten LR-Rekombinationen durchgeführt.

Tabelle 26: Liste der durch LR-Reaktion rekombinierten GUS-Konstrukte

Konstrukt-nummer	Promotorfragment	Entry-Vektor	Destinationsvektor
pGL2-pENTR1A	5'-GL2	pGL2-pENTR1A	PARB
R1	5'-GL1-Fragment1	Pr1	PARB
R2	5'-GL1-Fragment2	Pr3	PARB
R3	5'-GL1-Fragment3	Pr5	PARB
R4	5'-GL1-Fragment4	Pr7	PARB
R5	5'-GL1 (I)-gesamt von -1362 bis -124	Pr9	PARB
R6	3'-GL1	Pr11	PARB
R7	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment1	Pr1	PARB-3'-GL1-for
R8	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment2	Pr3	PARB-3'-GL1-for
R9	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment3	Pr5	PARB-3'-GL1-for
R10	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment4	Pr7	PARB-3'-GL1-for
R11	3'-GL1-for + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-3'-GL1-for
R12	3'-GL1-rev + 5'-GL1-Fragment1	Pr1	PARB-3'-GL1-rev
R13	3'-GL1-rev + 5'-GL1-Fragment2	Pr3	PARB-3'-GL1-rev
R14	3'-GL1-rev + 5'-GL1-Fragment3	Pr5	PARB-3'-GL1-rev
R15	3'-GL1-rev + 5'-GL1-Fragment4	Pr7	PARB-3'-GL1-rev
R16	3'-GL1-rev + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-3'-GL1-rev
R17	5'-WER-Fragment1	Pr18	PARB
R18	5'-WER-Fragment2	Pr19	PARB
R19	5'-WER-Fragment3	Pr20	PARB
R20	5'-WER-gesamt	Pr21	PARB
R21	5'-WER-Fragment1 + 3'-WER-for	Pr18	PARB-3'-WER-for
R22	5'-WER-Fragment2 + 3'-WER-for	Pr19	PARB-3'-WER-for
R23	5'-WER-Fragment3 + 3'-WER-for	Pr20	PARB-3'-WER-for
R24	5'-WER-gesamt + 3'-WER-for	Pr21	PARB-3'-WER-for
R25	5'-WER-Fragment1 + 3'-WER-rev	Pr18	PARB-3'-WER-rev
R26	5'-WER-Fragment2 + 3'-WER-rev	Pr19	PARB-3'-WER-rev
R27	5'-WER-Fragment3 + 3'-WER-rev	Pr20	PARB-3'-WER-rev
R28	5'-WER-gesamt + 3'-WER-rev	Pr21	PARB-3'-WER-rev
R29	5'-TRY-Fragment1	Pr13	PARB
R30	5'-TRY-Fragment2	Pr14	PARB
R31	5'-TRY-Fragment3	Pr15	PARB
R32	5'-TRY-gesamt	Pr16	PARB
R33	5'-TRY-Fragment4	Pr23	PARB
R34	5'-CPC-Fragment1	Pr17	PARB
R35	5'-CPC-gesamt	Pr24	PARB
R36	Kontrolle PARB	pENTR1a-ccdB	PARB
R37	Kontrolle 3'-GL1-for	pENTR1a-ccdB	PARB-3'-GL1-for
R38	Kontrolle 3'-GL1-rev	pENTR1a-ccdB	PARB-3'-GL1-rev
R39	Kontrolle 3'-WER-for	pENTR1a-ccdB	PARB-3'-WER-for
R40	Kontrolle 3'-WER-rev	pENTR1a-ccdB	PARB-3'-WER-rev
R68	Subfragment-3'-GL1a + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-28
R69	Subfragment-3'-GL1a	pENTR1a-ccdB	PARB-28
R70	Subfragment-3'-GL1b + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-29
R71	Subfragment-3'-GL1b	pENTR1a-ccdB	PARB-29
R72	Subfragment-3'-GL1c + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-30
R73	Subfragment-3'-GL1c	pENTR1a-ccdB	PARB-30
R74	Subfragment-3'-GL1d + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-31
R75	Subfragment-3'-GL1d	pENTR1a-ccdB	PARB-31
R76	Subfragment-3'-GL1e + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-32
R77	Subfragment-3'-GL1e	pENTR1a-ccdB	PARB-32
R78	5'-TRY-Fragment1 + Fragment33	Pr13	PARB-33

R79	5'-TRY-Fragment2 + Fragment33	Pr14	PARB-33
R80	5'-TRY-Fragment3 + Fragment33	Pr15	PARB-33
R81	5'-TRY-gesamt + Fragment33	Pr16	PARB-33
R82	5'-TRY-Fragment4 + Fragment33	Pr23	PARB-33
R83	5'-TRY-Fragment33	pENTR1a-ccdB	PARB-33
R90	5'-GL1 (II)-gesamt von -1362 bis -17	Pr-9a	PARB
R91	5'-GL1-Fusion Fragmente 1+2	Pr41	PARB
R93	5'-GL1-Fusion Fragmente 1+4 (bis -124)	Pr49	PARB
R94	5'-GL1-Fusion Fragmente 1+3 (bis -124)	Pr50	PARB
R95	5'-GL1-Fusion Fragmente 1+4 (bis -17)	Pr51	PARB
R96	5'-WER-Subfragmente-5	Pr52	PARB
R97	5'-WER-Subfragmente-6	Pr53	PARB
R98	5'-WER-Subfragmente-7	Pr54	PARB
R99	5'-WER-Subfragmente-8	Pr55	PARB
R100	5'-WER-Subfragmente-9	Pr56	PARB
R101	5'-WER-Subfragmente-10	Pr57	PARB
R102	5'-WER-Subfragmente-11	Pr58	PARB
R103	5'-WER-Subfragmente-12	Pr59	PARB
R104	5'-WER-Subfragmente-13	Pr60	PARB
R105	5'-WER-Subfragmente-14	Pr61	PARB
R106	5'-GL1 Fragment 2+3 (bis-124)	Pr62	PARB
R107	5'-GL1 Fragment 2+3 (bis -7)	Pr63	PARB
R114	Elimination der Gateway-Kassette PARB-28	-	PARB-28-GW
R115	Elimination der Gateway-Kassette PARB-29	-	PARB-29-GW
R116	Elimination der Gateway-Kassette PARB-30	-	PARB-30-GW
R117	Elimination der Gateway-Kassette PARB-31	-	PARB-31-GW
R118	Elimination der Gateway-Kassette PARB-32	-	PARB-32-GW
R119	PARB-3'-GL1-for Elimination der Gateway-Kassette	-	PARB-3'-GL1-for-GW
R120	PARB-3'-GL1-rev	-	PARB-3'-GL1-rev-GW
R142	5'-TRY-Subfragment a von Fragment 4	Pr80	PARB-33
R143	5'-TRY-Subfragment b von Fragment 4	Pr81	PARB-33
R144	5'-TRY-Subfragment c von Fragment 4	pENTR1a-ccdB	PARB-33-71
R150	3'-Deletion von Subfragment-3'-GL1a	Pr64	PARB
R151	5'-Deletion von Subfragment-3'-GL1c	Pr65	PARB
R152	5'-Deletion von Subfragment-3'-GL1e	Pr66	PARB
R153	Deletion 5'-TRY-Fragment 4	Pr73	PARB-33
R154	Kontrolle für die Elimination der Gateway-Kassette	-	PARB-GW
R161	5'-GL1 (III)-gesamt von -1411 bis -124	Pr78	PARB
R162	5'-GL1 (IV)-gesamt von -1411 bis -17	Pr79	PARB
R175	5'-GL1-Subfragment a von Fragment1	Pr82	PARB
R176	5'-GL1-Subfragment b von Fragment1	Pr83	PARB
R177	5'-GL1-Subfragment c von Fragment1	Pr84	PARB
R178	5'-GL1-Subfragment d von Fragment1	Pr85	PARB
R179	5'-GL1-Subfragment e von Fragment1	Pr86	PARB
R180	GL1 Intron1	PR87	PARB
R182	5'-Deletion von Subfragment-3'-GL1a	Pr97	PARB
R187	3'-Deletion von Subfragment-3'-GL1c	Pr102	PARB
R188	3'-Deletion von Subfragment-3'-GL1c	Pr103	PARB
R192	3'-Deletion von Subfragment-3'-GL1e	Pr107	PARB
R193	5'-TRY-Subfragment d von Fragment 4	Pr108	PARB
R195	5'-Deletion 5'-CPC-Fragment1	Pr110	PARB
R196	5'-Deletion 5'-CPC-Fragment2	Pr111	PARB
R197	5'-Deletion 5'-CPC-Fragment3	Pr112	PARB
R198	3'-Deletion 5'-CPC-Fragment4	Pr113	PARB

R199	3'-Deletion 5'-CPC-Fragment5	Pr114	PARB
R200	3'-Deletion 5'-CPC-Fragment6	Pr115	PARB
R214	3'-GL1-Subfragment c1	pENTR1a-ccdB	PARB-67
R215	3'-GL1-Subfragment c2	pENTR1a-ccdB	PARB-68
R216	3'-GL1-Subfragment c3	pENTR1a-ccdB	PARB-74
R217	3'-GL1-Subfragment c4	pENTR1a-ccdB	PARB-75
R218	3'-GL1-Subfragment c5	pENTR1a-ccdB	PARB-77
R220	3'-GL1-Subfragmentc6 (AtHB1AT+MYB)	Pr117	PARB
R222	5'-GL1 (IV)-gesamt von -1411 bis -17 (Col)	Pr79-Col	PARB
R224	5'-TRY-Subfragment d von Fragment 4 + 5'-TRY Fragment33	Pr108	PARB-33
R225	Mutation 5'-CPC Fragment1 (mutidenTRY)	Pr143	PARB
R226	Mutation 5'-CPC Fragment1 (mutMYB1)	Pr145	PARB
R227	Mutation 5'-CPC Fragment1 (mutMYB2)	Pr146	PARB
R228	Mutation 5'-CPC Fragment1 (mutW-BOX1)	Pr147	PARB

Tabelle 27: Liste der durch LR-Reaktion rekombinierten Rettungskonstrukte

Hintergrund	Konstrukt-nummer	Promotorfragment	Entry-Vektor	Destinationsvektor
<i>gll(39F12)</i>	R60	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment1	Pr1	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R61	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment2	Pr3	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R62	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment3	Pr5	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R63	3'-GL1-for + 5'-GL1-Fragment4	Pr7	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R64	3'-GL1-for + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R65	3'-GL1-for	pENTR1A-ccdB	PARB-3'-GL1-for-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R66	5'-GL1 (I)-gesamt	Pr9	PARB-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R67	Kontrolle	pENTR1A-ccdB	PARB-GL1-cDNA
<i>wer-1</i>	R85	5'-WER-Fragment1	Pr18	PARB-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R86	5'-WER-Fragment2	Pr19	PARB-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R87	5'-WER-Fragment3	Pr20	PARB-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R88	5'-WER-Fragment4	Pr21	PARB-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R89	Kontrolle	pENTR1A-ccdB	PARB-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R109	5'-WER-Fragment1 + 3'-WER-for	Pr18	PARB-3'-WER-for-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R110	5'-WER-Fragment2 + 3'-WER-for	Pr19	PARB-3'-WER-for-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R111	5'-WER-Fragment3 + 3'-WER-for	Pr20	PARB-3'-WER-for-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R112	5'-WER-gesamt + 3'-WER-for	Pr21	PARB-3'-WER-for-WER-cDNA
<i>wer-1</i>	R113	3'-WER-for	pENTR1A-ccdB	PARB-3'-WER-for-WER-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R121	Subfragment-3'-GL1a + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-28-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R122	Subfragment-3'-GL1a	pENTR1A-ccdB	PARB-28-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R123	Subfragment-3'-GL1b + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-29-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R124	Subfragment-3'-GL1b	pENTR1A-ccdB	PARB-29-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R125	Subfragment-3'-GL1c + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-30-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R126	Subfragment-3'-GL1c	pENTR1A-ccdB	PARB-30-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R127	Subfragment-3'-GL1d + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-31-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R128	Subfragment-3'-GL1d	pENTR1A-ccdB	PARB-31-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R129	Subfragment-3'-GL1e + 5'-GL1 (I)	Pr9	PARB-32-GL1-cDNA
<i>gll(39F12)</i>	R130	Subfragment-3'-GL1e	pENTR1A-ccdB	PARB-32-GL1-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R133	5'-TRY-Fragment3 + Fragment33	Pr15	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R134	5'-TRY-gesamt + Fragment33	Pr16	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R135	5'-TRY-Fragment4 + Fragment33	Pr23	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R136	5'-TRY-Fragment33	pENTR1A-ccdB	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R137	3'GL1 + 5'-TRY-Fragment33	Pr11	PARB-33-TRY-cDNA

<i>try82</i>	R138	3'GL1	Pr11	PARB-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R139	5'-TRY-Fragment4	Pr23	PARB-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R156	5'-CPC-Fragment1	Pr17	PARB-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R157	5'-CPC-gesamt	Pr24	PARB-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R158	5'-CPC-Fragment1 + 5'-TRY-Fragment33	Pr17	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>	R159	5'-CPC-gesamt + 5'-TRY-Fragment33	Pr24	PARB-33-TRY-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R160	5'-GL1-Fragment1	Pr1	PARB-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R163	5'-TRY-Fragment3 + Fragment33	Pr15	PARB-33-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R164	5'-TRY-gesamt + Fragment33	Pr16	PARB-33-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R165	5'-TRY-Fragment4 + Fragment33	Pr23	PARB-33-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R169	5'-CPC-Fragment1 + 5'-TRY-Fragment33	Pr17	PARB-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R170	5'-CPC-gesamt + 5'-TRY-Fragment33	Pr24	PARB-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R171	5'-TRY-Fragment33	pENTR1A-ccdB	PARB-33-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R172	5'-GL1 (II)-gesamt	Pr9a	PARB-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R173	5'-GL1 (III)-gesamt	Pr78	PARB-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R174	5'-GL1 (IV)-gesamt	Pr79	PARB-GL1-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R202	5'-TRY-Subfragment a von Fragment 4	Pr80	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R203	5'-TRY-Subfragment b von Fragment 4	Pr81	PARB-33-TRY-cDNA
<i>try82</i>				
<i>cpc-1 try-82</i>	R204	5'-TRY-Subfragment d von Fragment 4	Pr108	PARB-33-TRY-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R205	5'-GL1-Fragment1 + Subfragment 3'-GL1c	Pr1	PARB-30-GL1-cDNA
<i>gli(39F12)</i>	R223	5'-GL1 (IV)-gesamt (Col)	Pr79-Col	PARB-GL1-cDNA

Herstellung der Konstrukte für die N-terminalen His-Proteinfusionen

Zur Herstellung der N-terminalen Histidin-Proteinfusionen wurden die Entryklone GL1-pENTR1A, GL2-pENTR1A, WER-pENTR1A, GL3-pDONR201, TRY-pDONR201, AtMYB23-pDONR201, CPC-pENTR4 und TTG-pENTR4 mit dem Vektor pDEST17 rekombiniert, wodurch GL1-, GL2-, GL3-, WER-, ATMYB23-, TRY-, CPC- und TTG-pDEST17 entstanden.

Herstellung der C-terminal HA-fusionierten Konstrukte für Pflanze

Die Konstrukte für die C-terminalen HA-Proteinfusionen wurden durch LR-Rekombination des Vektors pAMPAT-HA-GA mit den Entry-Vektoren GL1-, GL2-, GL3-, WER-, ATMYB23-, TRY-, CPC- und TTG-ost-pDONR201 hergestellt, wodurch die Konstrukte 35S-GL1-HA-pAMPAT, usw. entstanden.

4.4 Proteinexpression in Bakterien

Zur Identifikation der Proteinexpression in Bakterien, wurden die Bakterien in einer Vorkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag wurde jeweils 1ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium überimpft. Die Medien enthielten zur Selektion Carbenizillin in einer Konzentration von 50 µg/ ml.

4.4.1 Bestimmung der optimalen IPTG-Konzentration

In einem ersten Versuch zur Einschätzung der besten IPTG-Induktionskonzentration wurden je 10 ml der frisch angeimpften Hauptkultur bei 37°C angezogen, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,6 (ca. 4 Stunden) erreichten. Dann wurde sie mit IPTG zu einer Endkonzentration von 0; 0,4; 0,7 bzw. 1,0

mM versetzt und weitere 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Je 4ml der Kultur wurden 5 min bei 4°C und 5000 rpm pelletiert, mit 400 µl Cracking-Puffer versehen und 5 min auf 100°C erhitzt. Je 10 µl des Rohextraktes und 12 µl der Proteinleiter (Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, Gibco BRL) wurden auf einer denaturierenden SDS-PAGE mit einem 4%igem Sammelgel und einem 14%igem Trenngel mit Laemmli-Puffer aufgetrennt und durch anschließende Coomassie-Färbung visualisiert.
10xLaemmli-Puffer: 250mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,5% SDS

4.4.2 *Aufreinigung des Proteins über Ni-NTA-Agarose*

Zur Aufreinigung des mit N-terminalen Histidin-Resten versehenen Proteins wurden 100 ml Bakterienkultur wie oben beschrieben angezogen und nach ca. 4 Stunden mit IPTG zu einer Konzentration von 1mM versetzt und für weitere 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Bakteriensuspension durch 20 minütige Zentrifugation bei 6.500 rpm und 4°C pelletiert und das Pellet wurde in 3ml Tris/ HCl (20mM, pH 7,4) resuspendiert. Es wurden 24 µl Lysozym (10 mg/ml) zugeben und für 40 min bei 30°C inkubiert und für 2-3 min Beschallung im Ultraschallbad. Dann wurde das Lysat 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Zwischenzeitlich wurde die Ni-NTA-Agarose (Quiagen) vorbereitet. Dazu wurden 50 µl Ni-NTA-Agarose 5min bei 13.000 rpm zentrifugiert und zweimal mit 500 µl destilliertem Wasser gewaschen, indem bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert wurde. Dann wurde das Pellet in 500µl Puffer 2 aufgenommen und wie zuvor zentrifugiert.

Der Überstand des Lysates wurde auf zwei Eppendorfgefäß mit jeweils 50µl vorbereiteter, pelletierter Ni-NTA-Agarose überführt, resuspendiert, 45 min bei 4°C und 700 rpm inkubiert und dann 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Rohextrakt wurde abgenommen und auf das Pellet wurden jeweils 333 µl Puffer 2 gegeben und beide Proben vereint. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min wurde das Pellet nach Abnahme des Überstandes in 500 µl Puffer 3 aufgenommen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Dann erfolgte die Aufnahme der Pellets nacheinander nach jeweiliger Zentrifugation in 150 µl Puffer 4, 5 und 6.

Die Probenentnahme für die nachfolgende Auftrennung auf einer SDS-PAGE erfolgte für alle Schritte der Aufreinigung:

Vor der Zugabe von IPTG und nach der Induktion mit IPTG wurden 2 ml Kultur für 5 min bei 5.000 rpm und 4°C pelletiert und mit 200 µl Cracking Puffer versehen, für 5 min auf 100°C erhitzt. 5µl bis 10 µl wurden auf dem SDS-Gel eingesetzt.

Je 15 µl Rohextrakt nach der Lyse, Überstand nach der Inkubation mit der Matrix, sowie Überstand mit Puffer 2, 3, 4, 5 und 6 wurden entnommen und mit je 15 µl 2xProbenpuffer versehen. Von diesem Gemisch wurden 10 µl auf dem Gel eingesetzt. Zum Größenvergleich wurden 12 µl der

Proteinleiter (Prestained Protein Ladder 10-190 kDa, Roche) benutzt. Alle Proben wurden bis zum Auftragen bei 4°C gelagert und zusammen mit der Proteinleiter für 10 min bei 99°C denaturiert.

<i>Cracking-Puffer:</i>	60 mM Tris/ HCl pH 6,8, 1% β -Mercaptoethanol, 1% SDS, 10% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau
<i>2xProben-Puffer:</i>	80 mM Tris/ HCl, pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,006% Bromphenolblau, 15% Glycerin
<i>Puffer1:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol
<i>Puffer2:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol, 8 mM Imidazol
<i>Puffer3:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol, 15 mM Imidazol
<i>Puffer4:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol, 35 mM Imidazol
<i>Puffer5:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol, 150 mM Imidazol
<i>Puffer6:</i>	20 mM Tris/ HCl pH 7,4, 10mM β -Mercaptoethanol, 250 mM Imidazol

4.5 Biochemische Analyse von pflanzlichen Proteinen

4.5.1 Denaturierender Proteinextrakt und gelelektrophoretische Auftrennung

Zwei bis drei älteren Blätter wurden im flüssigen Stickstoff in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das Pulver wurde dann mit dem Auftragspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt und sofort für 10 min bei 95°C denaturiert. Nach Zentrifugation (15000 rpm, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, so dass ein vollständige Abtrennung des Sedimentes ermöglicht wurde.

<i>Auftragspuffer</i>	50 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 36% (w/v) Harnstoff (8 M), 30% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,5% (w/v) Bromphenolblau
-----------------------	--

4.5.2 Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

20 μ l des Proteinextraktes wurden mit 180 μ l Aqua bidest. verdünnt und mit 4 Volumina der Fällungslösung gemischt und anschließend bei 15 krpm 20 min abzentrifugiert. Das gefällte Protein wurde in 1 ml Waschlösung aufgenommen, gevortext und abzentrifugiert (15krpm, 10 min). Der Überstand wurde vollständig abgenommen, und das luftgetrocknete Pellet in 1 ml 0,2 M NaOH unter Vortexen gelöst.

Der absolute Proteingehalt wurde durch Messung der Extinktion bei 615 nm im Photometer bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Eichkurve berechnet.

<i>Fällungslösung:</i>	10% (v/v) Essigsäure, 90% (v/v) Methanol, eine Spatelspitze Amidoschwarz
------------------------	--

Waschlösung: 10% (v/v) Essigsäure, 90% (v/v) Methanol

4.5.3 TCA-Fällung

Die Proteinlösung wurde mit 1/10 des Volumens der Lösung A gemischt, gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1/10 des Volumens der Lösung B zugegeben und gevortext. Anschließend wurde 30 min bei 13 krpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Aceton versetzt und gevortext. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und in Probenpuffer aufgenommen (Bensadoun und Weinstein, 1976).

Lösung A: 0,15% (w/v) Natriumdesoxycholat

Lösung B: 72% (w/v) Trichloressigsäure

Aceton: 80% Aceton (-20°C)

4.5.4 SDS-PAGE

Die Proteine wurden in einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurde ein 14%iges Acrylamid-Trenngel, 4%iges Acrylamid-Sammelgel und Laemmli-Puffer eingesetzt.

Es wurden entweder 25 µl des Gesamtextraktes oder 25 µg des Gesamtproteins eingesetzt. Als Größenmarker diente die Prestained Protein Ladder 10-160 kDa (MBI-Fermentas).

10xLaemmli-Puffer: 250mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,5% SDS

4.5.5 Western-Blotting

Das Blotting wurde mittels des Semidry-Verfahrens durchgeführt. Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel abgeschnitten und in den Kathodenpuffer transferiert. Die zurechtgeschnittene PVDF-Membran (Roti®-PVDF, Roth) (d.h. Gelgröße + 0,5 cm an allen Seiten) wurde äquilibriert. Dazu wurde sie zunächst kurz in 60% Methanol und dann in Anodenpuffergeschwenkt. Das eigentliche Blotting erfolgte mit einem Elektrobloetter. Der Transfer erfolgte bei 0,65 mA/ cm² für ca. 2 Stunden bei 4°C.

Kathodenpuffer: 1xWBB, 0,1% (w/v) SDS

Anodenpuffer: 1xWBB, 30% (v/v) Methanol

1xWBB: 20mM Tris, 150mM Glycin

4.5.6 Antikörperdetektion und Visualisierung

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran in 60% Methanol angefeuchtet und in TBS überführt und dann 1 Stunde in Blockierlösung geschüttelt. Anschließend wurden 7 ml der primären Antikörperlösung gegen die Blockierlösung ausgetauscht und eine Stunde geschüttelt. Dann wurde erneut viermal je 10 min mit 50 ml Blockierlösung gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation mit 10 ml der sekundären Antikörperlösung unter schütteln. Dann wurde dreimal je 10

min mit 50 ml Blockierlösung, zweimal mit 50 ml TBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation der Membran in 10 ml Färbsubstrat (Promega, Western Blue) lichtdicht für maximal 15 min.

<i>TBS:</i>	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
<i>Blockierlösung:</i>	Roti-®-Block (Roth)
<i>TBST</i>	TBS mit 0,1% Tween 20
<i>Anti-HA-Antikörperlösung:</i>	100µg/ml Stammlösung (Roche 1867423), 1:2.000 in TBST
<i>Anti-Rat-AP-Antikörperlösung:</i>	Anti-Rat IgG (Whole Molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate 1:10.000 in TBST (Sigma A-8438)
<i>Anti -HIS-Antikörperlösung:</i>	Anti-Penta-HIS (Quiagen 34660), 1:2.000 in TBST
<i>Anti-Mouse-AP-Antikörperlösung:</i>	Anti-Mouse IgG (Whole Molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate 1:10.000 in TBST (Sigma A-3562)

4.6 Pflanzentransformation

4.6.1 Stabile Transformation

Zur stabilen Transformation von Pflanzen wurde die florale Tunkmethode (floral dip) (Clough und Bent, 1998) benutzt. Dazu wurden 60 bis 90 Pflanzen bis zum Erscheinen der ersten Blüten, dies entspricht einer Wuchshöhe von ca. 10 cm, angezogen. 6 Tage vor der Transformation wurde die Agrobakterium-Lagerkultur mit dem jeweiligen Konstrukt in einer 5 ml Vorkultur (YEB mit den jeweiligen Antibiotika) angeimpft und 3 Tage bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Danach wurde die Vorkultur in 400 ml desselben Mediums überimpft und unter denselben Bedingungen inkubiert.

Zur Transformation wurden die Bakterienkulturen für 15 min bei 4000 rpm bei Raumtemperatur pelletiert und in 5%ige Saccharoselösung mit 0,05% Silvett-77 (Loveland Industries) aufgenommen. Die Pflanzen wurde mit den Infloreszenzen für ca. 25 sec in die leicht gerührte Bakteriensuspension getunkt und dann in horizontaler Lage in einem feuchten Mikroklima, indem sie mit einer Haube abgedeckt wurden, bei Raumtemperatur über Nacht stehen gelassen. Dabei wurden die Sprossachsen abgestützt, damit die durch Silvett instabilisierten Blüten nicht den Boden berührten. Anschließend wurden die Pflanzen im Gewächshaus wieder wie gewöhnlich behandelt. Nach 2 Wochen wurden sie in Pergaminfaltbeutel eingetütet und nach weiteren 4 Wochen die reifen Samen gesammelt.

4.6.2 *Transiente Transformation*

Zur transienten Transformation wurde die biolistische Methode gewählt. Als Pflanzenmaterial dienten Pflanzen auf MS-Agarplatte, wobei 30-40 Samen auf einer Fläche von ca. 3 cm Durchmesser in der Mitte einer Petrischale ausgebracht wurden. Die Pflanzen wurden nach ca. 7 Tagen Wachstum im Klimaschrank zum Beschuss eingesetzt.

Für den Partikelbeschuss wurden zunächst die Mikrocarrier vorbereitet. 60 mg Gold (1,0 μm) wurden mit 1 ml 70%igem Ethanol kräftig gevortext, anschließend für 15 min inkubiert und dann bei 15krpm für 15 sec zentrifugiert. Dann wurde zweimal mit 1 ml Aqua bidest. gewaschen und die Goldpartikel für jeweils 10 sec und 10krpm pelletiert. Das Goldpellet wurde dann in 0,5 ml Wasser aufgenommen und für 3 sec beschallt (Microtip Limit 4, Konstante Beschallung mit Branson Sonifer 250). Anschließend wurde das Gold in 50 μl Aliquots während dem Vortexen aufgeteilt.

Für je einen Beschuss wurden zu 5 μl Gold-Suspension bis zu 6 μl Plasmid-DNA, 10 μl CaCl_2 (2,5 M) und 4 μl Spermidin (free Base 0,1 M) unter ständigem Vortexen gegeben und für 10-15 min stark geschüttelt. Dabei wurde von jeder Plasmid-DNA (0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eingesetzt. Zur Kontrolle wurde immer das Plasmid 35S::GFP zugegeben. Anschließend wurde für 10 sec und 6000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 50 μl 70%iges Ethanol aufgenommen und nach kurzem Resuspendieren erneut zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 12 μl 100%igem Ethanol aufgenommen und erneut für 3 sec mit Ultraschall (s.o.) beschallt. Wenn mehr als ein Ansatz gleichzeitig vorbereitet wurde, wurden alle Volumina entsprechend erhöht.

In einer Petrischale wurde der Makrocarrier im zugehörigen Metallhalter vorbereitet. 10 μl der Mikrocarriersuspension wurden unter Vortexen aufgenommen und auf die Mitte eines Makrocarrier pipettiert. In der Speed-Vac wurde das Ethanol bis zur völligen Trockne der Mikrocarrier verdampft. Die beladenen Makrocarrier wurden in der Beschuss-Apparatur Biolistic® Particle Delivery System (Model PDS-1000/ He von Biorad) eingebaut und die Pflanzen-MS-Platten auf Schiene 3 eingesetzt. Zum Beschuss wurde ein Vacuum von 26 mm Quecksilbersäule (in. Hg vac) aufgebaut und ein Druck von 900 psi benutzt. Danach wurden die MS-Platten wieder verschlossen und über Nacht erneut im Klimaschrank inkubiert. Ca. 24 h nach dem Beschuss wurden die getroffenen Pflanzen mittels GFP-Fluoreszenz mit dem UV-Binokular selektiert und der GUS-Färbung unterzogen.

4.7 Methoden zur Pflanzenarbeit

4.7.1 *Pflanzenanzucht auf Erde*

Die Pflanzenanzucht erfolgte entweder auf Erde oder auf Agar-Platten. Die Anzucht auf frisch bereiteter Kulturerde fand in Pflanzenräumen bei 18°C oder bei 23°C unter konstanten 16 Stunden Licht- und 8 Stunden-Dunkelbedingungen statt. Die Samen wurden auf feuchte Erde ausgebracht und zur Stratifikation 2 Tage bei 4°C und Dunkelheit gelagert. Die Aussaatschalen wurden bis zum Erscheinen der Kotyledonen mit einer Haube zur Erhöhung der Feuchtigkeit abgedeckt.

4.7.2 *Selektion von Pflanzen auf Erde*

Die Selektion durch Basta erfolgte zum einen auf Erde. Dabei wurden die Pflanzen nach ca. 7 (beim Erscheinen des ersten und zweiten Blattes) und 14 Tagen mit Bastalösung (0,1% Basta (Aventis, Düsseldorf), 0,01% Tween 80 in Leitungswasser (Lagerung bei 4°C) besprüht. Nach weiteren 7 Tagen konnten dann die selektierten Pflanzen auf frische Erde umgesetzt oder zur Analyse herangezogen werden.

4.7.3 *Herstellung von MS-Platten und Additive*

MS-Platten (1% Murashige-Skoog-Salze, 1% Saccharose, 0,7% Pflanzen Agar-Agar) wurden nach eventueller Zugabe des jeweiligen Selektionsmarkers in das ca. 55°C warme Medium in Petrischalen unter sterilen Bedingungen gegossen.

Dabei handelte es sich um Basta (Glufosinate ammonium; Dr. Ehrenstorfer GmbH), Kanamycin und Hygromycin mit Endkonzentrationen von 20 µg/ ml, 50 µg/ml bzw. 35 µg/ ml.

Paclobutrazol (Sigma-Aldrich) wurde auf die bereits erkalteten MS-Platten zu einer Endkonzentration von 10⁻⁶ M pipettiert und auf der Oberfläche verteilt. Für zwei Tage wurden die Platten stehen gelassen, um eine gleichmäßige Diffusion der Wachstumsstoffe zu gewährleisten.

4.7.4 *Sterilisation von Samen*

Vor der Aussaat auf sterilen MS-Agar-Platten wurden die Samen oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie 5 Minuten in 95% Ethanol (Rotisol) und danach 15-30 Minuten in 3%-iger NaClO₄-Lösung, die 0,1%-iger Triton-X-100 enthält, inkubiert. Anschließend wurden sie mit 0,01% Tween 80-Lösung gewaschen und mit Aqua bidest. oder 0,15% Agar-Lösung auf Platte ausplattiert. Auch hier erfolgte Stratifikation bei 4°C für zwei Tage im Dunkeln. Die Anzucht erfolgte in einem Pflanzenanzuchtschrank (Rumed, Laatzen) bei 22°C 16 Stunden Tag-/ 8 Stunden Nacht-Bedingungen. Für die Betrachtung von Trichom-Phänotypen wurden die Platten in horizontaler Ebene angezogen, für die Betrachtung von Wurzel-Phänotypen in vertikaler Ebene.

4.7.5 Kreuzungen

Mit einer feinen Pinzette (Inox 5, Roth) wurden die Stamina aus den fast noch geschlossenen Blüten der Akzeptorpflanze entfernt. Nach 2 Tagen erfolgte die Bestäubung der emaskulierten Blüten mit den Pollen der Donor-Pflanze.

4.8 Mikroskopie und Zytologische Methoden

4.8.1 Analyse der GUS-Reporter-Linien

4.8.2 Histochemie

Die GUS-Aktivität wurde nach der Methode von Marathe bzw. Sessions untersucht (Marathe und McEwen, 1995; Sessions *et al.*, 1999).

Die GUS-Färbelösung setzt sich folgendermaßen zusammen: 50mM NaPO₄ (pH 7.2), 2mM Kaliumferrocyanid (K₄Fe(CN)₆), 2mM Kaliumferricyanid (K₃Fe(CN)₆) und 0,2% Triton-X-100 sowie 2mM X-Gluc (Roth oder MBI-Fermentas). Dabei wurde eine 50fache Stammlösung von X-Gluc in Dimethylformamid angesetzt. Um eine vollständige Penetration der Färbelösung zu ermöglichen, wurden mehrere Pflanzen einer Linie in der Färbelösung einer 20-minütigen Vakuuminfiltration bei 0,8 bar unterzogen. Anschließend wurden die Proben 1 bis 24 Stunden inkubiert. In wenigen Fällen erfolgte die Inkubation über 2 Nächte. Die Entfärbung erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe in den Stufen 10%, 30%, 50% und 70% bei Raumtemperatur.

4.8.3 Mikroskopie

Die GUS entfärbten Proben wurden in 50% Ethanol unter dem Binokular präpariert und dann mikroskopiert. Die Lichtmikroskopie wurde mit einem LEICA-DMRE Mikroskop ausgeführt, dabei wurde die DIC- Optik von LEICA benutzt. Bilder wurden mit der angeschlossenen hochauflösenden KY-F70 3-CCD JVC Kamera und der DISKUS-Software (DISKUS, Technisches Büro, Königswinter) aufgenommen und mit Adobe Photoshop 6.0 und Adobe Illustrator 5.0 Software bearbeitet und zusammengestellt.

4.8.4 Analyse der GUS gefärbten Pflanzen

Pflanzen zur Untersuchung der Blattphänotypen wurden nach 18 Tagen Wachstum und der Wurzelphänotypen nach 5 Tagen Wachstum der GUS-Färbung unterzogen.

Transformierte Pflanzen wurden in der T1-Generation durch GUS-Färbung auf Expression getestet. In der T2-Generation wurden die Pflanzen kategorisiert in schwache und starke Linien. Dazu wurden 20-30 verschiedene T2-Linien ausgesät. Die stärksten Linien wurden phänotypisch dokumentiert.

Gekreuzte Linien wurden, wenn es sich um dominante Merkmalsträger handelte, in der F1- und F2-Generation angesehen im Fall von rezessiven wurde auf die F2 und F3 zurückgegriffen.

Um die Kotyledonen, die dem Partikel-Bombardement unterzogen wurden, zu untersuchen, wurden die Pflanzen 24 Stunden nach dem Beschuss auf GFP-Fluoreszenz am UV-Binokular (Leica MZFLIII) untersucht und alle getroffenen Pflanzen in GUS-Färbelösung gesammelt und der Färbeprozedur über Nacht unterzogen.

4.8.5 Dokumentation morphologischer Phänotypen

Die Dokumentation der pflanzlichen Phänotypen wurde mit dem Binokular Leica MZFLIII, der Kamera Scion (Model CFW 1310C, Chromaphor Analyse Technik GmbH) und dem Programm Image J (Free Software über <http://rsb.info.nih.gov/ij/> von Research Services Branch (RSB) der National Institute of Mental Health (NIMH)) durchgeführt.

4.8.6 Auswertung der Rettung der Hintergründe *gl1*, *try* und *cpc try*

Die phänotypische Variationsbreite der transformierten Linien war außerordentlich groß. In der vorliegenden Arbeit wurde es deshalb vermieden, die Analyse der Rettungseffizienzen der Konstrukte auf wenige, willkürlich ausgewählte Linien in der T2-Generation zu basieren. Stattdessen wurden möglichst viele T1-Pflanzen (ca. 100) analysiert, um das ganze Spektrum der Phänotypen zu erfassen T1-Pflanzen wurden gewählt, da sie nicht das Problem der heterozygoten und homozygoten Allel-Kombinationen der T2-Pflanzen beinhalten (Diese Unterscheidung kann nur durch die Identifikation von Einzelinsertionslinien in Kombination mit der Rückkreuzung zur Bestimmung der Homozygotie bestimmt werden). Folgende Strategien wurden genutzt:

Für die Rettung der *gl1(39F12)* Mutante wurden für jede einzelne T1-Pflanze die Trichomzahlen auf den Rosettenblättern 1, 2, 3 und 4 bestimmt. Anschließend wurde getrennt für jedes Rosettenblatt die Zahl der T1-Pflanzen bestimmt, die ein Trichom, zwei Trichome, drei Trichome usw. besitzen. Dann konnte die Anzahl der Trichome gegen die Zahl der T1-Pflanzen, die jeweils eine bestimmte Zahl von Trichomen besitzen, als Diagramm gegeneinander aufgetragen werden (s. z.B. Abb. 17). Zusätzlich wurde die maximale Trichomzahl auf den ersten vier Rosettenblättern in tabellarischer Form gesondert festgehalten (s. z.B. Tab. 1).

Für die Rettung der *try*-82 Mutante wurden zum einen, die Zahl der Trichominitiationsstellen (TIS), wie für *gl1(39F12)* beschrieben bestimmt (s. z.B. Abb. 94). Des Weiteren wurde für jede T1-Pflanze ermittelt, welche Anzahl von Clustern sich auf den ersten vier Rosettenblättern befindet, und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der TIS bestimmt. Diese Anteile wurden in Kategorien von 0%, 1-4,9%, ... und 25-29,9% unterteilt. Für jede T1-Pflanze konnte dann bestimmt werden, welcher Häufigkeitskategorie sie angehört, und für die Gesamtheit der T1-Pflanzen die

Anzahl der T1-Pflanzen mit der jeweiligen Häufigkeitskategorie und damit ihr prozentualer Anteil an der Gesamtheit der T1-Pflanzen. In einem Diagramm wurden die Häufigkeitskategorien der Cluster gegen die Anteile der T1-Pflanzen mit der jeweiligen Kategorie dargestellt (s. z.B. Abb. 79).

Neben der Clusterhäufigkeit wurde auch die Verzweigungszahl der Trichome für die *try* Rettung bestimmt. Dazu wurde die Anzahl der Trichome mit jeweils einer, zwei, drei vier und fünf Verzweigungen (Verzweigungsgrad) auf den Rosettenblättern 1 bis 4 ermittelt. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Trichome auf Blatt 1 bis 4 wurde bestimmt. Diese prozentualen Anteile wurden in Kategorien aufgeschlüsselt (0%, 0,1-9,9%, 10-19,9%, ..., 100%). Anschließend wurde für jeden Verzweigungsgrad die Anzahl der T1-Pflanzen bestimmt, die in die jeweilige Häufigkeitskategorie fallen und diese Anzahlen für jeden Verzweigungsgrad in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (s. z.B. Abb. 83).

Für die Rettung der *cpc-1 try-82* Doppelmutante wurde das Merkmal der Clusterhäufigkeit, wie bereits für *try-82* beschrieben, bestimmt (s. z.B. Abb. 80). Da die Größe der Cluster stark variiert, wurden die drei Typen „2-Trichome pro Cluster“, „3-Trichome pro Cluster“ und „mehr als 3-Trichome pro Cluster“ zusätzlich untersucht. Dabei wurde für jede T1-Pflanze einzeln analysiert, welche Anzahl des jeweiligen Clustertyps sich auf den ersten vier Rosettenblättern befindet und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Cluster bestimmt. Diese prozentualen Anteile wurden wieder in Kategorien aufgeschlüsselt (0%, 0,1-9,9%, 10-19,9%, ..., 100%) und weiter wie für das Merkmal „Cluster“ verfahren (s. z.B. Abb. 81).

LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003a). Arabidopsis *AtMYC2* (*bHLH*) and *AtMYB2* (*MYB*) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.
- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. und Shinozaki, K. (1997). Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**, 1859-68.
- Abe, M., Katsumata, H., Komeda, Y. und Takahashi, T. (2003b). Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 635-43.
- Abe, M., Takahashi, T. und Komeda, Y. (2001). Identification of a cis-regulatory element for L1 layer-specific gene expression, which is targeted by an L1-specific homeodomain protein. *Plant J* **26**, 487-94.
- Alvarez-Buylla, E. R., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F. und Yanofsky, M. F. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *Plant J* **24**, 457-66.
- Anderson, J. P., Badruzsaufari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R. und Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3460-79.
- Aoyama, T., Dong, C. H., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Ruberti, I., Morelli, G. und Chua, N. H. (1995). Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator *Athb-1* alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* **7**, 1773-85.
- ArabidopsisGenomeInitiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Arnone, M. I. und Davidson, E. H. (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* **124**, 1851-64.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. und Struhl, K. (1994). Current Protocols in Molecular Boplogy. USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Bailey, P. C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P. H., Huq, E., Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M. und Weisshaar, B. (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **15**, 2497-502.
- Banerji, J., Rusconi, S. und Schaffner, W. (1981). Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell* **27**, 299-308.
- Baranowskij, N., Frohberg, C., Prat, S. und Willmitzer, L. (1994). A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *Embo J* **13**, 5383-92.
- Baudry, A., Heim, M. A., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B. und Lepiniec, L. (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **39**, 366-80.
- Bäurle, I. und Laux, T. (2005). Regulation of *WUSCHEL* transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell*.
- Becker, A. und Theissen, G. (2003). The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogenet Evol* **29**, 464-89.
- Benfey, P. N. und Chua, N. (1990a). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959-966.

- Benfey, P. N. und Chua, N. H.** (1990b). The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* **250**, 959-966.
- Benfey, P. N., Ren, L. und Chua, N. H.** (1990a). Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains. *Embo J* **9**, 1685-96.
- Benfey, P. N., Ren, L. und Chua, N. H.** (1990b). Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *Embo J* **9**, 1677-84.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D.** (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochem.* **70**, 241-250.
- Berger, F., Haseloff, J., Schiefelbein, J. W. und Dolan, L.** (1998a). Positional information in root epidermis is defined during embryogenesis and acts in domains with strict boundaries. *Curr. Biol.* **8**, 421-430.
- Berger, F., Hung, C.-Y., Dolan, L. und Schiefelbein, J. W.** (1998b). Control of cell division in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* **194**, 235-245.
- Berger, F., Linstead, P. J., Dolan, L. und Schiefelbein, J. W.** (1998c). Stomata patterning on the hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* is controlled by genes involved in the control of root epidermis patterning. *Dev. Biol.* **194**.
- Bernhardt, C., Lee, M. M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A. und Schiefelbein, J.** (2003). The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* **130**, 6431-9.
- Bernhardt, C., Zhao, M., Gonzalez, A., Lloyd, A. und Schiefelbein, J.** (2005). The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the *Arabidopsis* root epidermis. *Development* **132**, 291-8.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-23.
- Blanc, G. und Wolfe, K. H.** (2004). Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *Plant Cell* **16**, 1679-91.
- Blazquez, M. A. und Weigel, D.** (2000). Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* **404**, 889-92.
- Boffelli, D., McAuliffe, J., Ovcharenko, D., Lewis, K. D., Ovcharenko, I., Pachter, L. und Rubin, E. M.** (2003). Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science* **299**, 1391-4.
- Boggon, T. J., Shan, W. S., Santagata, S., Myers, S. C. und Shapiro, L.** (1999). Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* **286**, 2119-25.
- Bonifer, C.** (2000). Developmental regulation of eukaryotic gene loci: which cis-regulatory information is required? *Trends Genet* **16**, 310-5.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. und Prat, S.** (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes Dev* **18**, 1577-91.
- Bouyer, D.** (2004). Analysis of trichome differentiation in *Arabidopsis thaliana*: From cell fate initiation to cell death. Universität Köln: Inaugural Dissertation.
- Boyle, B. und Brisson, N.** (2001). Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF. *Plant Cell* **13**, 2525-37.
- Buchel, A. S., Brederode, F. T., Bol, J. F. und Linthorst, H. J.** (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Mol Biol* **40**, 387-96.
- Busk, P. K. und Pages, M.** (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* **37**, 425-35.
- Carroll, S. B.** (2000). Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* **101**, 577-80.

- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inze, D., Sandberg, G., Casero, P. J. et al.** (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-52.
- Celenza, J. L., Jr., Grisafi, P. L. und Fink, G. R.** (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* **9**, 2131-42.
- Cercos, M., Gomez-Cadenas, A. und Ho, T. H.** (1999). Hormonal regulation of a cysteine proteinase gene, *EPB-I*, in barley aleurone layers: cis- and trans-acting elements involved in the co-ordinated gene expression regulated by gibberellins and abscisic acid. *Plant J* **19**, 107-118.
- Chakravarthy, S., Tuori, R. P., D'Ascenzo, M. D., Fobert, P. R., Despres, C. und Martin, G. B.** (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**, 3033-50.
- Chan, C. S., Guo, L. und Shih, M. C.** (2001). Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **46**, 131-41.
- Chandrasekharan, M. B., Bishop, K. J. und Hall, T. C.** (2003). Module-specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis. *Plant J* **33**, 853-66.
- Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, X. W. und Wei, N.** (1998). Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in *Arabidopsis*. *Plant J* **15**, 69-77.
- Chen, W. und Singh, K. B.** (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* *GST6* promoter is mediated in part by an *ocs* element. *Plant J* **19**, 667-77.
- Chen, Z. L., Pan, N. S. und Beachy, R. N.** (1988). A DNA sequence element that confers seed-specific enhancement to a constitutive promoter. *Embo J* **7**, 297-302.
- Chien, J. C. und Sussex, I. M.** (1996). Differential regulation of trichome formation on the adaxial and abaxial leaf surfaces by Gibberellins and photoperiod in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. *Plant Physiol.* **111**, 1321-1328.
- Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J. und Carrington, J. C.** (2001). *Arabidopsis* *RTM1* and *RTM2* genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* **127**, 1667-75.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-43.
- Cocciolone, S. M., Sidorenko, L. V., Chopra, S., Dixon, P. M. und Peterson, T.** (2000). Hierarchical patterns of transgene expression indicate involvement of developmental mechanisms in the regulation of the maize *Pl-rr* promoter. *Genetics* **156**, 839-46.
- Comai, L., Moran, P. und Maslyar, D.** (1990). Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements. *Plant Mol Biol* **15**, 373-81.
- Crawford, K. M. und Zambryski, P. C.** (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr Biol* **10**, 1032-40.
- Curaba, J., Herzog, M. und Vachon, G.** (2003). *GeBP*, the first member of a new gene family in *Arabidopsis*, encodes a nuclear protein with DNA-binding activity and is regulated by KNAT1. *Plant J* **33**, 305-17.
- Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M. und Vachon, G.** (2004). *AtGA3ox2*, a Key Gene Responsible for Bioactive Gibberellin Biosynthesis, Is Regulated during Embryogenesis by *LEAFY* *COTYLEDON2* and *FUSCA3* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **136**, 3660-3669.
- Davidson, E. H.** (2001). Genomic regulatory systems. San Diego: Academic Press.

- Dean, G., Casson, S. und Lindsey, K.** (2004). KNAT6 gene of *Arabidopsis* is expressed in roots and is required for correct lateral root formation. *Plant Mol Biol* **54**, 71-84.
- Degenhardt, J. und Tobin, E. M.** (1996). A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an *Lhcb* promoter is more abundant in etiolated than in green plants. *Plant Cell* **8**, 31-41.
- Deyholos, M. K. und Sieburth, L. E.** (2000). Separable whorl-specific expression and negative regulation by enhancer elements within the *AGAMOUS* second intron. *Plant Cell* **12**, 1799-810.
- DiChristina, M. D., Sessa, G., Dolan, L., Linstead, P. J., Baima, S., Ruberti, I. und Morelli, G.** (1996). The *Arabidopsis* *Athb-10* (*GLABRA2*) is an HD-Zip protein required for regulation of root hair Development. *Plant J.* **10**, 393-402.
- Doebley, J. und Lukens, L.** (1998). Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* **10**, 1075-82.
- Dolan, L.** (2001a). How and where to build a root hair. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 550-554.
- Dolan, L.** (2001b). Plant development: the benefits of a change of scene. *Curr Biol* **11**, R702-4.
- Dolan, L. und Costa, S.** (2001). Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 413-417.
- Dolan, L., Duckett, C., Grierson, C. S., Linstead, P. J., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poething, S. und Roberts, K.** (1994). Clonal relations and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**, 2465-2474.
- Dolan, L., Linstead, P., Kidner, C., Boudonck, K., Cao, X. F. und Berger, F.** (1998). Cell fate in plants. Lessons from the *Arabidopsis* root. *Symp Soc Exp Biol* **51**, 11-7.
- Downes, B. P., Stupar, R. M., Gingerich, D. J. und Viestra, D.** (2003). The *HECT* ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: *UPL3* has a specific role in trichome development. *Plant J.* **35**, 729-742.
- Doyle, J. J. und Doyle, J. L.** (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* **12**, 13-15.
- Edelman, G. M., Meech, R., Owens, G. C. und Jones, F. S.** (1999). Synthetic promoter elements obtained by nucleotide sequence variation and selection for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3038-3043.
- El Refy, A., Perazza, D., Zekraoui, L., Valay, J. G., Bechtold, N., Brown, S., Hülskamp, M., Herzog, M. und Bonneville, J. M.** (2003). The *Arabidopsis* *KAKTUS* gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol Genet Genomics* **270**, 403-14.
- Esch, J. J., Chen, M., Sanders, M., Hillestad, M., Ndkium, S., Idelkope, B., Neizer, J. und Marks, M. D.** (2003). A contradictory *GLABRA3* allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 5885-94.
- Esch, J. J., Chen, M. A., Hillestad, M. und Marks, M. D.** (2004). Comparison of *TRY* and the closely related *Atlg01380* gene in controlling *Arabidopsis* trichome patterning. *Plant J* **40**, 860-9.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. und Somssich, I. E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**, 199-206.
- Fang, R. X., Nagy, F., Sivasubramaniam, S. und Chua, N. H.** (1989). Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants. *Plant Cell* **1**, 141-50.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K. und Weisshaar, B.** (1994). Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* **6**, 1607-21.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. und Weisshaar, B.** (1997). PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit. *Plant J* **11**, 1079-93.

- Finkelstein, R. R., Gampala, S. S. und Rock, C. D.** (2002). Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**, S15-45.
- Finkelstein, R. R. und Lynch, T. J.** (2000). The *Arabidopsis* absciscic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**, 599-609.
- Flouriot, G., Brand, H. und Gannon, F.** (1999). Identification of differentially expressed 5'-end mRNA variants by an improved RACE technique (PEETA). *Nucleic Acids Res* **27**, e8.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. und Postlethwait, J.** (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-45.
- Forsbach, A., Schubert, D., Lechtenberg, B., Gils, M. und Schmidt, R.** (2003). A comprehensive characterization of single-copy T-DNA insertions in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Plant Mol Biol* **52**, 161-76.
- Fu, X. und Harberd, N. P.** (2003). Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740-3.
- Galway, M. E., Masucci, J. D., Lloyd, A. M., Walbot, V., Davis, R. W. und Schiefelbein, J. W.** (1994). The *TTG* gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.* **166**, 740-754.
- Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M. und McCourt, P.** (2004). The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and absciscic acid. *Dev Cell* **7**, 373-85.
- Gill, G.** (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* **in Press**.
- Gowik, U., Burscheidt, J., Akyildiz, M., Schlue, U., Koczor, M., Streubel, M. und Westhoff, P.** (2004). cis-Regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene. *Plant Cell* **16**, 1077-90.
- Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B. und Peterson, T.** (1994). The *myb*-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**, 543-553.
- Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K. und Jacobsen, J. V.** (1995). Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**, 1879-91.
- Gumucio, D. L., Heilstedt-Williamson, H., Gray, T. A., Tarle, S. A., Shelton, D. A., Tagle, D. A., Slightom, J. L., Goodman, M. und Collins, F. S.** (1992). Phylogenetic footprinting reveals a nuclear protein which binds to silencer sequences in the human gamma and epsilon globin genes. *Mol Cell Biol* **12**, 4919-29.
- Guo, H., Chen, X., Zhang, H., Fang, R., Yuan, Z., Zhang, Z. und Tian, Y.** (2004). Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin *PP2* gene promoter. *Transgenic Res* **13**, 559-66.
- Guo, H. und Moose, S. P.** (2003). Conserved noncoding sequences among cultivated cereal genomes identify candidate regulatory sequence elements and patterns of promoter evolution. *Plant Cell* **15**, 1143-58.
- Gutierrez-Alcala, G., Calo, L., Gros, F., Caissard, J. C., Gotor, C. und Romero, L. C.** (2005). A versatile promoter for the expression of proteins in glandular and non-glandular trichomes from a variety of plants. *J Exp Bot.*
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M. und Laux, T.** (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 657-68.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nurnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I. E. et al.** (2003). Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- Hamilton, D. A., Schwarz, Y. H. und Mascarenhas, J. P.** (1998). A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Mol Biol* **38**, 663-9.
- Haralampidis, K., Milioni, D., Rigas, S. und Hatzopoulos, P.** (2002). Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* gene. *Plant Physiol* **129**, 1138-49.
- Hartmann, U., Sagasser, M., Mehrrens, F., Stracke, R. und Weisshaar, B.** (2005). Differential combinatorial interactions of cis-acting elements recognized by R2R3-MYB, BZIP, and BHLH factors control light-responsive and tissue-specific activation of phenylpropanoid biosynthesis genes. *Plant Mol Biol* **57**, 155-71.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B. und Bailey, P. C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* **20**, 735-47.
- Hernandez, J. M., Heine, G. F., Irani, N. G., Feller, A., Kim, M. G., Matulnik, T., Chandler, V. L. und Grotewold, E.** (2004). Different mechanisms participate in the R-dependent activity of the R2R3 MYB transcription factor C1. *J Biol Chem* **279**, 48205-13.
- Herrmann, U.** (2002). Identifikation neuer Interaktionspartner von Trichom-Entwicklungsgenen mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System. Universität Köln: Diplomarbeit.
- Hohn, T. und Fütterer, J.** (1992). Transcriptional and translational control of gene expression in cauliflower mosaic virus. *Curr Opin Genet Dev* **2**, 90-6.
- Hong, R. L., Hamaguchi, L., Busch, M. A. und Weigel, D.** (2003). Regulatory elements of the floral homeotic gene *AGAMOUS* identified by phylogenetic footprinting and shadowing. *Plant Cell* **15**, 1296-309.
- Howard, M. L. und Davidson, E. H.** (2004). cis-Regulatory control circuits in development. *Dev Biol* **271**, 109-18.
- Huang, N., Sutliff, T. D., Litts, J. C. und Rodriguez, R. L.** (1990). Classification and characterization of the rice alpha-amylase multigene family. *Plant Mol Biol* **14**, 655-68.
- Hülkamp, M.** (2004). Plant trichomes: a model for cell differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 471-80.
- Hülkamp, M., Miséra, S. und Jürgens, G.** (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**, 555-566.
- Hülkamp, M. und Schnittger, A.** (1998). Spatial regulation of trichome formation in *Arabidopsis thaliana*. *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 213-220.
- Hülkamp, M., Schnittger, A. und Folkers, U.** (1999). Pattern formation and cell differentiation: trichomes in *Arabidopsis* as a genetic model system. *Int. Rev. Cytol.* **186**, 147-178.
- Hung, C.-Y., Lin, Y., Zhang, M., Pollack, S., Marks, M. D. und Schiefelbein, J. W.** (1998). A common position-dependent mechanism controls cell-type patterning and *GLABRA2* regulation in the root and hypocotyl epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **117**, 73-84.
- Huttly, A. K., Phillips, A. L. und Tregear, J. W.** (1992). Localisation of cis elements in the promoter of a wheat alpha-Amy2 gene. *Plant Mol Biol* **19**, 903-11.
- Ishida, T., Hattori, S., Okada, K. und Wada, T.** (2004). Analysis of TRANSPARENT TESTA *GLABRA2* involved in trichome differentiation. 15th International Conference on Arabidopsis Research, T02-068.
- Ishiguro, S. und Nakamura, K.** (1994). Characterization of cDNA encoding a novel DNA binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol Gen Genet* **244**, 563-571.
- Jacobsen, S. E. und Olszewski, N. E.** (1993). Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* **5**, 887-96.

- Jin, H. und Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol Biol* **41**, 577-85.
- Johannesson, H., Wang, Y. und Engstrom, P.** (2001). DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Mol Biol* **45**, 63-73.
- Johnson, C. S., Kolevski, B. und Smyth, D. R.** (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* **14**, 1359-75.
- Kagaya, Y., Ohmiya, K. und Hattori, T.** (1999). *RAV1*, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. *Nucleic Acids Res* **27**, 470-8.
- Kao, C. Y., Cocciolone, S. M., Vasil, I. K. und McCarty, D. R.** (1996). Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the *C1* gene of maize. *Plant Cell* **8**, 1171-9.
- Kawaoka, A., Kaothien, P., Yoshida, K., Endo, S., Yamada, K. und Ebinuma, H.** (2000). Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J* **22**, 289-301.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M. und McPherson, J.** (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1229-1302.
- Keith, K., Kraml, M., Dengler, N. G. und McCourt, P.** (1994). *fusca3*: A heterochronic mutation affecting late embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 589-600.
- Kellogg, E. A.** (2001). Root hairs, trichomes and the evolution of duplicate genes. *Trends Plant Sci* **6**, 550-2.
- Kim, S. Y., Ma, J., Perret, P., Li, Z. und Thomas, T. L.** (2002). *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol* **130**, 688-97.
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schafer, E. und Frohnmeyer, H.** (1998). *CPRF4a*, a novel plant bZIP protein of the *CPRF* family: comparative analyses of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol Gen Genet* **257**, 595-605.
- Kirik, V. und Bäumlein, H.** (1996). A novel leaf-specific myb-related protein with a single binding repeat. *Gene* **183**, 109-13.
- Kirik, V., Lee, M. M., Wester, K., Herrmann, U., Zheng, Z., Oppenheimer, D., Schiefelbein, J. und Hülskamp, M.** (2005). Functional diversification of *MYB23* and *GLI* genes in trichome morphogenesis and initiation. *Development* **132**, 1477-85.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hülskamp, M. und Bäumlein, H.** (2001). Ectopic expression of the *Arabidopsis AtMYB23* gene induces differentiation of trichome cells. *Dev. Biol.* **235**, 366-377.
- Kirik, V., Simon, M., Hülskamp, M. und Schiefelbein, J.** (2004a). The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol* **268**, 506-13.
- Kirik, V., Simon, M., Wester, K., Schiefelbein, J. und Hülskamp, M.** (2004b). *ENHANCER of TRY and CPC 2* (ETC2) reveals redundancy in the region-specific control of trichome development of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **55**, 389-98.
- Koch, M. A., Weisshaar, B., Kroymann, J., Haubold, B. und Mitchell-Olds, T.** (2001). Comparative genomics and regulatory evolution: conservation and function of the *Chs* and *Apetala3* promoters. *Mol Biol Evol* **18**, 1882-91.
- Kollmar, R. und Farnham, P. J.** (1993). Site-specific initiation of transcription by RNA polymerase II. *Proc Soc Exp Biol Med* **203**, 127-39.
- Koornneef, M.** (1981). The complex syndrome of *ttg* mutants. *Arab. Inf. Serv.* **18**, 45-51.
- Koornneef, M., Dellaert, L. W. M. und van der Veen, J. H.** (1982). EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat. Res.* **93**, 109-123.

- Koshino-Kimura, Y., Wada, T., Tachibana, T., Tsugeki, R., Ishiguro, S. und Okada, K.** (2005). Regulation of *CAPRICE* transcription by MYB proteins for root epidermis differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.*
- Kurepa, J., Walker, J. M., Smalle, J., Gosink, M. M., Davis, S. J., Durham, T. L., Sung, D.-Y. und Viestra, R. D.** (2003). The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 6862-6872.
- Kwak, S. H., Shen, R. und Schiefelbein, J.** (2004). Positional Signaling Mediated by a Receptor-like Kinase in *Arabidopsis*. *Science*.
- Lai, L. B., Nadeau, J. A., Lucas, J., Lee, E. K., Nakagawa, T., Zhao, L., Geisler, M. und Sack, F. D.** (2005). The *Arabidopsis* R2R3 MYB Proteins FOUR LIPS and MYB88 Restrict Divisions Late in the Stomatal Cell Lineage. *Plant Cell*.
- Larkin, J. C., Brown, M. L. und Schiefelbein, J.** (2003). How do cells know what they want to be when they grow up? Lessons from epidermal patterning in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 403-30.
- Larkin, J. C., Marks, M. D., Nadeau, J. und Sack, F.** (1997a). Epidermal cell fate and patterning in leaves. *Plant Cell* **9**, 1109-1120.
- Larkin, J. C., Oppenheimer, D. und Marks, M. D.** (1997b). The *GL1* gene and the trichome developmental pathway in *Arabidopsis thaliana*. In *Plant Promoters and Transcription Factors*, (ed. L. Nover), pp. 259-275. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Larkin, J. C., Oppenheimer, D. G., Lloyd, A. M., Paparozzi, E. T. und Marks, M. D.** (1994). Roles of the *GLABROUS1* and *TRANSPARENT TESTA GLABRA* genes in *Arabidopsis* trichome development. *Plant Cell* **6**, 1065-1076.
- Larkin, J. C., Oppenheimer, D. G., Pollack, S. und Marks, M. D.** (1993). *Arabidopsis GLABROUS1* gene requires downstream sequences for function. *Plant Cell* **5**, 1739-1748.
- Larkin, J. C., Walker, J. D., Bolognesi-Winfield, A. C., Gray, J. C. und Walker, A. W.** (1999). Allele-specific interactions between *ttg* and *gll* during trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **151**, 1591-1604.
- Larkin, J. C., Young, N., Prigge, M. und Marks, M. D.** (1996). The control of trichome spacing and number in *Arabidopsis*. *Development* **122**, 997-1005.
- Lee, M. M. und Schiefelbein, J.** (2001). Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 1539-46.
- Lee, M. M. und Schiefelbein, J.** (2002). Cell pattern in the *Arabidopsis* root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* **14**, 611-8.
- Lee, M. M. und Schiefelbein, J. W.** (1999). *WEREWOLF*, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.
- Lin, Y. und Schiefelbein, J.** (2001). Embryonic control of epidermal cell patterning in the root and hypocotyl of *Arabidopsis*. *Development* **128**, 3697-705.
- Liu, H. C., Creech, R. G., Jenkins, J. N. und Ma, D. P.** (2000). Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene *Ltp3*. *Biochim Biophys Acta* **1487**, 106-11.
- Lloyd, A. M., Walbot, V. und Davis, R. W.** (1992). *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators R and C1. *Science* **258**, 1773-1775.
- Logemann, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.

- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. und Harada, J. J.** (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**, 1195-205.
- Lu, P., Porat, R., Nadeau, J. A. und O'Neill, S. D.** (1996). Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**, 2155-68.
- Lynch, M. und Force, A.** (2000). The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**, 459-73.
- Malamy, J. E. und Benfey, P. N.** (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Marathe, S. V. und McEwen, J. E.** (1995). Vectors with the gus reporter gene for identifying and quantitating promoter regions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **154**, 105-7.
- Marks, M. D.** (1997). Molecular genetic analysis of trichome development in *Arabidopsis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 137-163.
- Marks, M. D., Esch, J., Herman, P., Sivakumaran, S. und Oppenheimer, D.** (1991). A model for cell-type determination and differentiation in plants. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **45**, 77-87.
- Martin, C. und Paz-Ares, J.** (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends Genet* **13**, 67-73.
- Masucci, J. D., Rerie, W. G., Foreman, D. R., Zhang, M., Galway, M. E., Marks, M. D. und Schiefelbein, J. W.** (1996). The homeobox gene *GLABRA 2* is required for position-dependent cell differentiation in the root epidermis of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **122**, 1253-1260.
- Masucci, J. D. und Schiefelbein, J. W.** (1994). The *rhod6* mutation in *Arabidopsis thaliana* alters root-hair initiation through an auxin- and ethylene-associated process. *Plant Physiol.* **106**, 1335-1346.
- Mauricio, R. und Rausher, M. D.** (1997). Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* **51**, 1435-1444.
- McCue, L., Thompson, W., Carmack, C., Ryan, M. P., Liu, J. S., Derbyshire, V. und Lawrence, C. E.** (2001). Phylogenetic footprinting of transcription factor binding sites in proteobacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 774-82.
- Meinhardt, H. und Gierer, A.** (1974). Applications of a theory of biological pattern formation based on lateral inhibition. *J. Cell Sci.* **15**, 321-346.
- Meinhardt, H. und Gierer, A.** (2000). Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *BioEssays* **22**, 753-60.
- Meinke, D. W., Franzmann, L. H., Nickle, T. C. und Yeung, E. C.** (1994). Leafy Cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 1049-1064.
- Melchior, F.** (2000). SUMO—Nonclassical ubiquitin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 591-626.
- Misera, S., Muller, A. J., Weiland-Heidecker, U. und Jurgens, G.** (1994). The *FUSCA* genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. *Mol Gen Genet* **244**, 242-52.
- Miséra, S., Müller, J. A., Weiland-Heidecker, U. und Jürgens, G.** (1994). The *FUSCA* genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 242-252.
- Molina, C. und Grotewold, E.** (2005). Genome wide analysis of *Arabidopsis* core promoters. *BMC Genomics* **6**, 25.
- Montiel, G., Gantet, P., Jay-Allemand, C. und Breton, C.** (2004). Transcription factor networks. Pathways to the knowledge of root development. *Plant Physiol* **136**, 3478-85.

- Moore, R. C. und Purugganan, M. D.** (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 122-8.
- Nagano, Y., Furuhashi, H., Inaba, T. und Sasaki, A.** (2001). A novel class of plant-specific zinc-dependent DNA-binding protein that bind to A/T-rich DNA sequences. *Nucl Acid Res* **29**, 4097-4105.
- Nagata, T., Todoriki, S., Hayashi, T., Shibata, Y., Mori, M., Kanegae, H. und Kikuchi, S.** (1999). Gamma-radiation induces leaf trichome formation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **120**, 113-20.
- Narusaka, Y., Nakashima, K., Shinwari, Z. K., Sakuma, Y., Furihata, T., Abe, H., Narusaka, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* **34**, 137-48.
- No, E., Zhou, Y. und Loopstra, C. A.** (2000). Sequences upstream and downstream of two xylem-specific pine genes influence their expression. *Plant Sci* **160**, 77-86.
- Odell, J. T., Nagy, F. und Chua, N. H.** (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-2.
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. und Yamaguchi, S.** (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**, 1591-604.
- Ogawa, M., Kusano, T., Katsumi, M. und Sano, H.** (2000). Rice gibberellin-insensitive gene homolog, OsGAI, encodes a nuclear-localized protein capable of gene activation at transcriptional level. *Gene* **245**, 21-9.
- Ohashi, Y., Oka, A., Rodrigues-Pousada, R., Possenti, M., Ruberti, I., Morelli, G. und Aoyama, T.** (2003). Modulation of phospholipid signaling by *GLABRA2* in root-hair pattern formation. *Science* **300**, 1427-30.
- Ohashi, Y., Oka, A., Ruberti, I., Morelli, G. und Aoyama, T.** (2002). Entopically additive expression of *GLABRA2* alters the frequency and spacing of trichome initiation. *Plant J* **29**, 359-369.
- Ohgishi, M., Oka, A., Morelli, G., Ruberti, I. und Aoyama, T.** (2001). Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *Plant J* **25**, 389-98.
- Ohno, S.** (1970). Evolution by Gene Duplication: Springer-Verlag.
- Oppenheimer, D., Herman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J. und Marks, M. D.** (1991). A *myb* gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* **67**, 483-493.
- Pabo, C. O. und Sauer, R. T.** (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* **61**, 1053-95.
- Parenicova, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D. S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H. E., Ingram, R. M., Kater, M. M., Davies, B. et al.** (2003). Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* **15**, 1538-51.
- Pauli, S., Rothnie, H. M., Chen, G., He, X. und Hohn, T.** (2004). The cauliflower mosaic virus 35S promoter extends into the transcribed region. *J Virol* **78**, 12120-8.
- Payne, C. T., Zhang, F. und Lloyd, A. M.** (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* **156**, 1349-1362.
- Perazza, D., Vachon, G. und Herzog, M.** (1998). Gibberellins promote trichome formation by up-regulating *GLABROUS1* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **117**, 375-383.
- Pesch, M. und Hülkamp, M.** (2004). Creating a two-dimensional pattern de novo during *Arabidopsis* trichome and root hair initiation. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 422-7.
- Piechulla, B., Merforth, N. und Rudolph, B.** (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Mol Biol* **38**, 655-62.

- Poulsen, C. und Chua, N.** (1988). Dissection of 5' upstream sequences for selective expression of the *Nicotiana plumbaginifolia rbcS-8B* gene. *Mol Gen Genet* **214**, 16-23.
- Purugganan, M. D.** (2000). The molecular population genetics of regulatory genes. *Mol Ecol* **9**, 1451-61.
- Quarrie, S. A. und Jones, H. G.** (1977). Effect of Absciscic Acid and water stress on development and morphology on wheat. *J Exp Bot* **28**, 192-203.
- Quattrocchio, F., Wing, J. F., van der Woude, K., Mol, J. N. und Koes, R.** (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J* **13**, 475-88.
- Raventos, D., Skriver, K., Schlein, M., Karnahl, K., Rogers, S. W., Rogers, J. C. und Mundy, J.** (1998). HRT, a novel zinc finger, transcriptional repressor from barley. *J Biol Chem* **273**, 23313-20.
- Rerie, W. G., Feldmann, K. A. und Marks, M. D.** (1994). The *GLABRA2* gene encodes a homeodomain protein required for normal trichome development in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **8**, 1388-1399.
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I. und Florencio, F. J.** (2004). The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* **134**, 1718-32.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. et al.** (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-10.
- Riechmann, J. L. und Ratcliffe, O. J.** (2000). A genomic perspective on plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 423-34.
- Robatzek, S. und Somssich, I. E.** (2001). A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, *AtWRKY6*, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J* **28**, 123-33.
- Robatzek, S. und Somssich, I. E.** (2002). Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* **16**, 1139-49.
- Rogers, S. O. und Bendich, A. J.** (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol* **5**, 69-76.
- Rombauts, S., Florquin, K., Lescot, M., Marchal, K., Rouze, P. und van de Peer, Y.** (2003). Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiol* **132**, 1162-76.
- Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpica, J. M., Leyva, A. und Paz-Ares, J.** (1998). More than 80 *R2R3-MYB* regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14**, 273-84.
- Rose, A. B. und Beliakoff, J. A.** (2000). Intron-mediated enhancement of gene expression independent of unique intron sequences and splicing. *Plant Physiol* **122**, 535-42.
- Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A. C., Iglesias, J., Leyva, A. und Paz-Ares, J.** (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**, 2122-33.
- Rushton, P. J., Macdonald, H., Huttly, A. K., Lazarus, C. M. und Hooley, R.** (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to conserved cis-elements in promoters of α -Amy2 genes. *Plant Mol Biol* **29**, 691-702.
- Rushton, P. J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B. und Somssich, I. E.** (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* **14**, 749-62.
- Sablowski, R. W., Moyano, E., Culianez-Macia, F. A., Schuch, W., Martin, C. und Bevan, M.** (1994). A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *Embo J* **13**, 128-37.

- Sakai, H., Aoyama, T. und Oka, A.** (2000). *Arabidopsis* *ARR1* and *ARR2* response regulators operate as transcriptional activators. *Plant J* **24**, 703-11.
- Sambrook und Russel.** (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Fernandez, R., Ardiles-Diaz, W., Van Montagu, M., Inze, D. und May, M.** (1998). Gene note. Cloning of a novel *Arabidopsis thaliana* RGA-like gene, a putative member of the VHIID-domain transcription factor family. *J Exp Bot* **49**, 1609-1610.
- Sandhu, J. S., Webster, C. I. und Gray, J. C.** (1998). A/T-rich sequences act as quantitative enhancers of gene expression in transgenic tobacco and potato plants. *Plant Mol Biol* **37**, 885-96.
- Santi, L., Wang, Y., Stile, M. R., Berendzen, K., Wanke, D., Roig, C., Pozzi, C., Muller, K., Muller, J., Rohde, W. et al.** (2003). The GA octonucleotide repeat binding factor BBR participates in the transcriptional regulation of the homeobox gene *Bkn3*. *Plant J* **34**, 813-26.
- Sawa, S.** (2002). Overexpression of the *AtmybL2* gene represses trichome development in *Arabidopsis*. *DNA Res* **9**, 31-4.
- Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J. und Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* **402**, 191-5.
- Scheffler, B., Franken, P., Schutt, E., Schrell, A., Saedler, H. und Wienand, U.** (1994). Molecular analysis of *C1* alleles in *Zea mays* defines regions involved in the expression of this regulatory gene. *Mol Gen Genet* **242**, 40-8.
- Schellmann, S.** (2001). *Epidermale Musterbildung in Arabidopsis thaliana: Molekulare und genetische Untersuchungen zur Rolle des TRIPTYCHON-Gens*. Universität Tübingen: Inaugural Dissertation.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jürgens, G. und Hülkamp, M.** (2002). *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *Embo J* **21**, 5036-5046.
- Schiefelbein, J.** (2003). Cell-fate specification in the epidermis: a common patterning mechanism in the root and shoot. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 74-8.
- Schmidt, W. und Schikora, A.** (2001). Different pathways are involved in phosphate and iron stress-induced alterations of root epidermal cell development. *Plant Physiol* **125**, 2078-84.
- Schnittger, A., Folkers, U., Schwab, B., Jürgens, G. und Hülkamp, M.** (1999). Generation of a spacing pattern: The role of *TRIPTYCHON* in trichome patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**, 1105-1116.
- Schnittger, A., Jürgens, G. und Hülkamp, M.** (1998). Tissue layer and organ specificity of trichome formation are regulated by *GLABRA1* and *TRIPTYCHON* in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 2283-2289.
- Schwechheimer, C. und Deng, X. W.** (2000). The COP/DET/FUS proteins-regulators of eukaryotic growth and development. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 495-503.
- Sessa, G., Carabelli, M., Ruberti, I., Luchetti, S., Baima, S. und Morelli, G.** (1994). Identification of distinct families of HD-ZIP proteins in *Arabidopsis thaliana*. In *Molecular-genetic analysis of plant development and metabolism*, (ed. P. Puigdomenech and G. Corruzi), pp. 411-426. Berlin: Springer-Verlag.
- Sessa, G., Morelli, G. und Ruberti, I.** (1993). The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *Embo J* **12**, 3507-17.
- Sessions, A., Weigel, D. und Yanofsky, M. F.** (1999). The *Arabidopsis thaliana* *MERISTEM LAYER 1* promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* **20**, 259-63.

- Shen, Q. und Ho, T. H.** (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* **7**, 295-307.
- Shen, Q., Zhang, P. und Ho, T. H.** (1996). Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell* **8**, 1107-19.
- Sidorenko, L., Li, X., Tagliani, L., Bowen, B. und Peterson, T.** (1999). Characterization of the regulatory elements of the maize *P-rr* gene by transient expression assays. *Plant Mol Biol* **39**, 11-9.
- Sidorenko, L. V., Li, X., Cocciolone, S. M., Chopra, S., Tagliani, L., Bowen, B., Daniels, M. und Peterson, T.** (2000). Complex structure of a maize Myb gene promoter: functional analysis in transgenic plants. *Plant J* **22**, 471-82.
- Sieburth, L. E. und Meyerowitz, E. M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355-65.
- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M. C., Zabeau, M. und Van de Peer, Y.** (2002). The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13627-32.
- Simpson, S. D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J* **33**, 259-70.
- Skriver, K., Olsen, F. L., Rogers, J. C. und Mundy, J.** (1991). cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7266-70.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J. N. und Koes, R.** (2000). *anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-32.
- Stockhaus, J., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1989). Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. *Plant Cell* **1**, 805-13.
- Stracke, R., Werber, M. und Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 447-56.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- Sun, T. P.** (2000). Gibberellin signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 374-380.
- Sun, T. P. und Gubler, F.** (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 197-223.
- Sutoh, K. und Yamauchi, D.** (2003). Two cis-acting elements necessary and sufficient for gibberellin-upregulated proteinase expression in rice seeds. *Plant J* **34**, 635-45.
- Swain, S. M., Tseng, T. S., Thornton, T. M., Gopalraj, M. und Olszewski, N. E.** (2002). SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiol* **129**, 605-15.
- Szymanski, D. B.** (2001). *Arabidopsis* trichome morphogenesis: A genetic approach to studying cytoskeletal function. *J. Plant Growth* **20**, 131-140.
- Szymanski, D. B., Jilk, R. A., Pollack, S. M. und Marks, M. D.** (1998a). Control of *GL2* expression in *Arabidopsis* leaves and trichomes. *Development* **125**.
- Szymanski, D. B., Klis, D. A., Larkin, J. C. und Marks, M. D.** (1998b). *cot1*: a regulator of *Arabidopsis* trichome initiation. *Genetics* **149**, 565-577.
- Szymanski, D. B., Lloyd, A. M. und Marks, M. D.** (2000). Progress in the molecular genetic analysis of trichome initiation and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **5**, 214-219.

- Szymanski, D. B. und Marks, M. D.** (1998). *GLABROUS1* overexpression and *TRIPTYCHON* Alter the cell cycle and trichome cell fate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2047-2062.
- Tang, W. und Perry, S. E.** (2003). Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15: an in vitro and in vivo study. *J Biol Chem* **278**, 28154-9.
- Tanimoto, M., Roberts, K. und Dolan, L.** (1995). Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **8**, 943-8.
- Telfer, A., Bollman, K. M. und Poethig, R. S.** (1997). Phase change and the regulation of trichome distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 645-654.
- Terzaghi, W. B. und Cashmore, A. R.** (1995). Light-regulated transcription. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. und Quail, P. H.** (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-70.
- Traw, M. B. und Bergelson, J.** (2003). Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **133**, 1-9.
- Tron, A. E., Welchen, E. und Gonzalez, D. H.** (2004). Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site. *Biochemistry* **43**, 15845-51.
- Tsuchiya, Y., Nambara, E., Naito, S., McCourt, P.** (2004). The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* **37**: 73–81.
- Ulmasov, T., Hagen, G. und Guilfoyle, T. J.** (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J* **19**, 309-19.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. und Shinozaki, K.** (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* **5**, 1529-39.
- van Hengel, A. J., Barber, C. und Roberts, K.** (2004). The expression patterns of arabinogalactan-protein *AtAGP30* and *GLABRA2* reveal a role for abscisic acid in the early stages of root epidermal patterning. *Plant J* **39**, 70-83.
- Wada, T., Kurata, T., Tominaga, R., Koshino-Kimura, Y., Tachibana, T., Goto, K., Marks, M. D., Shimura, Y. und Okada, K.** (2002). Role of a positive regulator of root hair development, *CAPRICE*, in *Arabidopsis* root epidermal cell differentiation. *Development* **129**, 5409-5419.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y. und K., O.** (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, *CPC*. *Science* **277**, 1113-1116.
- Wagner, A.** (1999). Redundant gene functions and natural selection. *J Evol Biol* **12**, 1-16.
- Wagner, A.** (2002). Selection and gene duplication: a view from the genome. *Genome Biol* **3**, reviews1012.
- Walker, A. W., Davison, P. A., Bolognesi-Winfield, A. C., James, C. M., Scrinivasan, N., Blundell, T. L., Esch, J. J., Marks, M. D. und Gray, J. C.** (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1349.
- Wang, E., Gan, S. und Wagner, G. J.** (2002). Isolation and characterization of the *CYP71D16* trichome-specific promoter from *Nicotiana tabacum* L. *J Exp Bot* **53**, 1891-7.
- Wang, R. L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L. und Doebley, J.** (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature* **398**, 236-9.
- Wang, S., Wang, J. W., Yu, N., Li, C. H., Luo, B., Gou, J. Y., Wang, L. J. und Chen, X. Y.** (2004). Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene. *Plant Cell* **16**, 2323-34.
- Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S. und Tobin, E. M.** (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* *Lhcb* gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.

- Wen, C. K. und Chang, C.** (2002). *Arabidopsis RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**, 87-100.
- West, M. A., Yee, K. M., Danao, J., Zimmermann, J. L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. und Harada, J. J.** (1994). *LEAFY COTYLEDON1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **6**, 1731-1745.
- Wester, K.** (2004). Untersuchung der epidermalen Musterbildungsprozesse am Beispiel der Trichom-Musterbildung in *Arabidopsis thaliana*. Universität Köln: Diplomarbeit.
- Windhövel, A., Hein, I., Dabrowa, R. und Stockhaus, J.** (2001). Characterization of a novel class of plant homeodomain proteins that bind to the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Flaveria trinervia*. *Plant Mol Biol* **45**, 201-14.
- Wu, C., Washida, H., Onodera, Y., Harada, K. und Takaiwa, F.** (2000). Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression. *Plant J* **23**, 415-21.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. und Chua, N. H.** (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**, 3024-36.
- Yanagisawa, S.** (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **7**, 555-60.
- Yanagisawa, S. und Schmidt, R. J.** (1999). Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* **17**, 209-14.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. und Chory, J.** (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell* **120**, 249-59.
- Yu, D., Chen, C. und Chen, Z.** (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPRI* gene expression. *Plant Cell* **13**, 1527-40.
- Yuh, C. H., Bolouri, H. und Davidson, E. H.** (1998). Genomic cis-regulatory logic: experimental and computational analysis of a sea urchin gene. *Science* **279**, 1896-902.
- Yuh, C. H., Bolouri, H. und Davidson, E. H.** (2001). Cis-regulatory logic in the endo16 gene: switching from a specification to a differentiation mode of control. *Development* **128**, 617-29.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C. T. und Lloyd, A.** (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all *TG1*-dependent pathways of *Arabidopsis*. *Development*.
- Zhou, D. X.** (1999). Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors. *Trends Plant Sci* **4**, 210-214.
- Zhu, J., Shi, H., Lee, B. H., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J. K., Hasegawa, P. M. und Bressan, R. A.** (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, *HOS9*, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9873-8.
- Zimmermann, I. M., Heim, M. A., Weisshaar, B. und Uhrig, J. F.** (2004). Comprehensive identification of *Arabidopsis thaliana* MYB transcription factors interacting with R/B-like BHLH proteins. *Plant J* **40**, 22-34.
- Zourelidou, M., de Torres-Zabala, M., Smith, C. und Bevan, M. W.** (2002). Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J* **30**, 489-97.

DANKE

Mein besonderer Dank gilt Prof. Martin Hülkamp, der mir dieses Thema gegeben hat und die Bearbeitung ermöglicht hat. Vor allem auch Danke für die Diskussionsbereitschaft und Denkanstöße. Für die erste Zeit meiner Doktorarbeit möchte ich auch Dr. Arp Schnittger danken, der mir einige kritische Gedanken vermittelt hat. Für einen Meilenstein im Umgang mit diesem Thema, danke ich Dr. Dierk Wanke für tief greifende Diskussionen über Promotoren.

Für die ausdauernde Hilfe bei Minipräps, Pflanzenpräps, PCRs, Pflanzentrafos und Samenabsammeln danke ich den beiden TAs Birgit Kernebeck und Britta Müller, ohne Euch! – unvorstellbar.

Danke auch der Gärtnerei, die mir einen solchen Durchsatz von Pflanzen ermöglicht hat. Und auch Uschi Claßen schulde ich einen Dank, ohne Deine organisierte Hilfe für uns alle, würde wohl keine produktive Arbeit möglich sein.

Meiner studentischen Hilfskraft Nicole Sausen gebührt ein ganz großes Dankeschön. Mit soviel Ausdauer immer dieselben Aufgaben erfüllen, Hut ab. Insbesondere die schnelle Hilfe in den letzten Monaten rechne ich Dir hoch an.

Danke an alle meine Laborkollegen. Insbesondere gilt der Dank aber denen, die viel von mir ertragen mussten: Stefanie Falk, Christina Weinl, Daniel Bouyer, Katja Wester. Steffi, danke für Dein ständiges Mut zu sprechen, die Hilfe bei römischen Zahlen, dem doppelseitigen Druck und die vielen netten Abende bei Kölsch und anderen guten Getränken. Christina, danke für dieses erste, ruhige Jahr am MPI, ich denke gerne daran zurück. Daniel, danke für die Gespräche, die auch oft genug fachlich waren. Katja, danke für das gute Gefühl, das Du mir ständig vermittelt hast. Danke auch an Claudia Hass, Du warst, trotzdem Du in einem anderen Labor warst, eine Bereicherung für mich.

Weiterhin möchte ich allen danken, die sich durch dieses nie enden wollende Werk „quälen“ mussten. Ich hoffe, es hat Euch auch was gebracht.

Zu guter Letzt möchte ich Birger Marin danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Motivation zum Durchhalten aufzubauen. Danke für Deine Diskussionsbereitschaft. Danke, dass Du mich in oft schwierigen Stunden ertragen hast.

ERKLÄRUNG

"Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Martin Hülskamp betreut worden."

LEBENS LAUF

Martina Pesch

29.03.1974 geboren in Schleiden

Schulbildung

1980-1984 Katholische Grundschule in Udenbreth

1984-1993 Clara-Fey-Gymnasium in Schleiden

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Akademische Ausbildung

1993-1995 Grundstudium in Biologie auf Lehramt für die Sekundarstufe I und II an der Universität Köln

1995-1996 Grundstudium in Chemie auf Lehramt für die Sekundarstufe I und II an der Universität Köln

1995 Zwischenprüfung Biologie

1996 Zwischenprüfung Chemie

1995-1997 Hauptstudium Biologie

1996-1997 Hauptstudium Chemie

1997-1998 Staatsexamensarbeit am Lehrstuhl für Anorganische Chemie an der Universität Köln, bei Prof. Kruck, Thema: „Ökologische Auswirkungen von Platin-Immissionen unter besonderer Berücksichtigung der oxidativen Mobilisierung des Platins in der Umgebung von Pflanzenwurzeln“

1998-1999 Erstes Staatsexamen in Biologie und Chemie für die Sekundarstufe I und II
In Biologie die Fächer: Pflanzenphysiologie, Pflanzenanatomie, Entwicklungsbiologie, Tierphysiologie und Humanbiologie

In Chemie die Fächer: Chemie der Metalle, Chemie der Nichtmetalle, Reaktionsmechanismen, Aufbau der Materie, Chemie der Naturstoffe

1999-2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor von Prof. Schmitz am Lehrstuhl für Botanik, Universität Köln

2001-2005 Doktorarbeit im Labor von Prof. Hülkamp am Lehrstuhl für Botanik, Universität Köln